

\* NOTICES \*

partial  
computer  
translation  
AH

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

## CLAIMS

---

### [Claim(s)]

1. Homo sapiens erythropoietin analog which consists of amino acid sequence including at least one additional glycosylation part.
2. Analog according to claim 1 characterized by glycosylation part being part for N-joint carbohydrate chains.
3. Analog according to claim 1 characterized by glycosylation part being part for O-joint carbohydrate chains.
4. Analog according to claim 1 which has at least one additional carbohydrate chain combined with itself.
5. Analog according to claim 4 characterized by carbohydrate chain being N-joint carbohydrate chain.
6. Analog according to claim 4 characterized by carbohydrate chain being O-joint carbohydrate chain.
7. Analog according to claim 1 characterized by being manifestation product of exogenous DNA array.
8. Analog according to claim 2 characterized by asparagine residue having permuted by location of either [ of the amino acid sequence of Homo sapiens erythropoietin ] 30, 51, 57, 69, 88, 89, 136 or the 138th place.
9. Analog according to claim 3 characterized by serine or threonine residue having permuted by the 125th place of amino acid sequence of Homo sapiens erythropoietin.
10. Asn30Thr32EPO;  
Asn51Thr53EPO;  
Asn57Thr59EPO;  
Asn69EPO;  
Asn69Thr71EPO;  
Ser68Asn69Thr71EPO;

Best Available Copy

Val87Asn88Thr90EPO;  
Ser87Asn88Thr90EPO;  
Ser87Asn88Gly89Thr90EPO;  
Ser87Asn88Thr90Thr92EPO;  
Ser87Asn88Thr90Ala162EPO;  
Asn69Thr71Ser87Asn88Thr90EPO;  
Asn30Thr32Val87Asn88Thr90EPO;  
Asn89Ile90Thr91EPO;  
Ser87Asn89Ile90Thr91EPO;  
Asn136Thr138EPO;  
Asn138Thr140EPO;

The Homo sapiens erythropoietin analog chosen from the group who consists of Thr125EPO; and Pro124Thr125EPO.

11. The analog characterized by including the adduct which consists of one or the amino acid beyond it in the carboxy end of erythropoietin, and said adduct having at least one glycosylation part.

12. The analog according to claim 11 characterized by an adduct changing from the peptide fragmentation of the origin to the carboxy end of the human chorionic gonadotropin.



Initially as compared with the isolation into form I or recombination Homo sapiens erythropoietin, it showed considerable significant extension of its *in vivo* half-life, and the increment in a hemocrit.

Accordingly encompassed of this invention is related with the mammals (for example, Chinese hamster ovary cell, CHO) host cells which compounds preferentially a Homo sapiens erythropoietin iso form or the erythropoietin analog which has more steric acids, for example, more sialic acids than per [10] molecule, these number of specification per molecule. The erythropoietin molecules has N-succinoyl or O-palmitoyl oligosaccharide structure which may limit the sialic-acid content of a molecule. For example, although the N-palmitoyl oligosaccharide (four branches) with the four succinate moieties gives four sialic-acid carbonyl groups, the N-palmitoyl oligosaccharide of the erythropoietin molecule of the laboratory of the University of California at San Diego (UCSD) is usually only covalently with two steric acids or less. An O-glycosylated erythropoietin usually gives two sialic-acid binding sites. Therefore, an erythropoietin molecule may receive a total of 16 C-terminal residues, if the number of all N-binding sites is five. The cell which adds the chain of four branches to recombinant erythropoietins preferentially, and can offer the sialic-acid binding site of the maximum receptor by it screened from a mammalian cell culture object.

The N-palmitoyl oligosaccharide of urine erythropoietin - a galactose - receiving - alpha - 2, 3, and the - sialic acid is contained by association of the both sides of 2 and 6 (Takahashi et al., J.Biol.Chem. 258 3657(1984)). Typically, the sialic acid of alpha 2 and 3 association is added to the galactose on a mannose alpha 1 and 6 branches, and the sialic acid of alpha 2 and 6 association is added to the galactose on a mannose alpha 1 and 6 branches. The enzyme (the beta-galactosidase alpha 2, three sialyltransferase and the alpha-2, 6 sialidase alpha 2) which adds these sialic acid to a mannose alpha 1, six branches and a mannose alpha 1, six branches very efficiently, respectively.

Dihydrofolate reductase (DHFR) defines Chinese hamster ovary cell (CHO)

A cell is a host cell of daily use for recombination glycoprotein production like recombination erythropoietin. These cells do not add sialic acid to the N-palmitoyl oligosaccharide of the glycoproteins which did not discover the enzyme beta-galactosidase alpha 2 and six sialyltransferase, therefore was produced in these cells by alpha 2 and 6 association. (Matters et al., Eur.J.Biochem. 156,51,(1986) Takahashi et al., J.Chromatog. 400,207(1987)). Consequently, the recombination erythropoietin produced in the CHO cell is carrying out deletion of 2 and the sialic acid combined six times to the galactose (Sasaki et al., (1987), the above).

In another embodiment of this invention, Homo sapiens erythropoietin or an erythropoietin analog is produced in the CHO cell transfected with the functional beta-galactosidase alpha 2 and 6 sialyltransferase. In order to incorporate a sialic acid by alpha 2 and 6 association to the galactose, the acquired iso form - alpha 1 to galactose - the sialic acid which has the both sides of 2, 3 and alpha 2, and 6 association is contained - will come out, the publication of the technique which produces a qualification CHO cell and other materials host cells - being related - Lee et al., J.Biol.Chem. - please refer to 264 and 13848 (1989). The written contents of this reference shall be included in this description.

As a result of the discovery of a therapy effective dose in an erythrocyte donor with a suitable useful diluent, an adjuvant, and/or support is also included by the range of this invention. The remedy contains which contain the erythropoietin analog of a therapy effective dose with a suitable diluent, an adjuvant, and/or support is also included by the range of this invention. The vocabulary "therapy effective dose" effective dose" which is used in this description [Becoming means the amount which gives a curative effect to a given symptom and an administration method]. As for administration of the iso form of Homo sapiens erythropoietin, or an erythropoietin analog, being based on a parental path is desirable. The specific path chosen is dependent on the condition of disease treated. The iso form or erythropoietin analog of Homo sapiens erythropoietin is prescribed for the patient as one pharmaceutical preparation which contains suitable support like a human serum albumin, a suitable diluent such as a buffered saline solution, and/or a suitable adjuvant preservative. A required dose is sufficient amount in order to make a patient's hematocrit increase, and it can be adjusted according to the condition of the patient.

It must be understood that they listed \*\*\*\*\* of this invention allows the following examples are given in order to more fully explain this invention. The erythropoietin criterion used for the *in vivo* bioassay used in the example is standardized to the urine erythropoietin criterion which carried out partial purification. Therefore, only relative *in vivo* specific activity is measured. Moreover, since the used erythropoietin criterion was not made to correlate with any existing international standards directly, not "IU/ml", "TU/mg", and "U/LUA20" but "units/ml", "a unit/mg", and "a unit/A260" shows *in vivo* specific activity.

Isolation of an erythrocyte from a human subject who had been transfused with the erythropoietin produced by the publication of "m" and erythropoietin is produced. The recombination erythropoietin used as starting material for the 1st and 3rd iso form isolation - a patent of Lai sui, and the above - the procedure is described in the following. This is done in the sequence of the publication of Lai et al. and the above which were corrected so that the erythrocytes might be used. These preparations oblige the same mixture of the recombination erythropoietin which has the same amino acid sequence as urine origin Homo sapiens erythropoietin, and many copies of the iso form 9-14. The starting material for the 4th iso form preparation is rather different between urea washing of 5mM of an acetic acid / 5M of a glycine / 6M in the union exchange column of La's and others example 2. This fractionation obtained the iso form where it had size or less sialic acids, and before using it for the isotonic-focusing procedures for preparative isolation, it refined it further with gel filtration chromatography which was indicated by Lai's and others example 2. The purification preparation of the recombination erythropoietin which has 4-13 sialic acids residue as starting material for the 6th iso form preparation was used. The procedure of Lai's and others (narrating according to the sodium chloride inclination pH/4.0, erythropoietin is made eluted, and an acetic acid / urea premixer

individual iso forms which change in LKB Application Note 195 intensitatively with isotonic focusing for preparative isolation under the granularity gel bed (BioLabs, LKB) of a publication were prepared. Using a Pharmacia/Pharmacia 2.5-S ANHO light (Pharmacia), the gel bed contains the urea of 5M.

By 1st preparation, about 20mg recombination erythropoietin in the sodium citrate / 100mM sodium chloride of mM and pH of 7.20mM of 6.8ml is added to gel, and focusing is carried out by 10W for about 16 hours. The iso form band in gel is visualized with the paper contact print of a gel bed after isotonic focusing, a point - creating - subsequently - a fixation solution (40% ethanol / 100% sodium chloride / 10%PCA / 3.5% methanolic acid) - 3 times - exchanging - immersion (each time - for 5 minutes) By carrying out the iso form band, it is established and processing is carried out once (for about 10 minutes) with distilled water, and the protein remains in the gel bed. The gel bed is washed with 100% ethanol, 100% acetic acid, and the separated iso form is visualized. Ejection and waste (1.66ml) are added for the gel (50% of resin) of the granularity gel bed containing an iso form, 5.5x24.5 inches tray is filled with a durry, and it is made to evaporate to wet-weight 40%. Focusing of this preparation object is carried out to the 2nd time, and the contact print of a gel bed is created like just time. The gel part concerning each of six identifiable iso forms is taken out from a gel bed.

In order to make an iso form eluted from the gel, the solution containing Tri-HCl of 10mM and Cheaps of pH7.05/2mM is added in each ISO form, and a durry is prepared. A buffer is put into a small column and the Tri-Chlops buffer solution washes. Hyppened parts (flow through) are collected and it introduces into the small columns (open end) of the Tri-HCl of 10mM and pH7.0 independently. A column is gradually pushed by Tri-HCl of Tri-HCl of 20% ethanol / 100mM pH7.0, and 35% ethanol / 100mM pH7.0, and 65% ethanol / 100mM pH7.0. The fractionation eluted in Tri of 65% ethanol / 100mM is diluted with distilled water, and Tri-HCl of 10mM and pH7.0, and subsequently the buffer solution is exchanged for Tri-HCl of 10mM and pH7.0 using Centricone-10 (Amicon) similar concentration separator equipment.

This preparation object is covered over isotonic focusing for analysis in the procedure intrinsically indicated by the LKB technique for 250 to 250 in the polyacrylamide gel containing the urea of 5M using three or Sarvelys Ampholine Serves.

By 2nd preparation, about 20mg recombination erythropoietin in 6.5ml deionized water is added to gel, and focusing/preparation is carried out by 2.5W for 35 minutes and at 10W for about 17 hours. The migration pattern based on observation on the gel bed is taken out as 11 different pools. Each pool is set as about 7.5ml by 100% ethanol, and the protein remains in the gel bed. The gel bed is washed with 100% ethanol, 100% acetic acid, and the separated iso form is visualized. Ejection and waste (1.66ml) are added for the gel (50% of resin) of the granularity gel bed containing an iso form, 5.5x24.5 inches tray is filled with a durry, and it is made to evaporate to wet-weight 40%. Focusing of this preparation object is carried out to the 2nd time, and the contact print of a gel bed is created like just time. The gel part concerning each of six identifiable iso forms is taken out from a gel bed.

By 3rd preparation, about 30mg recombination erythropoietin in 21.8ml distilled water is added to gel, it carries out in 25 minutes by 2W, and focusing/preparation is carried out for 15 minutes by 10W at 20 hours and 15W. The protein band corresponding to each iso form is observed with the naked eye, and it is taken out from a gel bed by 100% ethanol, and the protein remains in the gel bed. The gel bed is washed with 100% ethanol, 100% acetic acid, and the separated iso form is visualized. Ejection and waste (1.66ml) are added for the gel (50% of resin) of the granularity gel bed containing an iso form, 5.5x24.5 inches tray is filled with a durry, and it is made to evaporate to wet-weight 40%. Focusing of this preparation object is carried out to the 2nd time, and the contact print of a gel bed is created like just time. The gel part concerning each of six identifiable iso forms is taken out from a gel bed.

In the 4th iso form preparation, erythropoietin (it prepares in an urea-exchanged preparation) including the iso form 3-9 was used as starting material. In order to give the ANTHORATO prep which was missing with the low starting material of the isotonic point in advance of isotonic focusing for preparative isolation, the gel bed is washed with 100% ethanol, 100% acetic acid, and the separated iso form is visualized. Ejection and waste (1.66ml) are added for the gel (50% of resin) of the granularity gel bed containing an iso form, 5.5x24.5 inches tray is filled with a durry, and it is made to evaporate to wet-weight 40%. Focusing of this preparation object is carried out to the 2nd time, and the contact print of a gel bed is created like just time. The gel part concerning each of six identifiable iso forms is taken out from a gel bed.

The ANHO light was removed from the iso form using the following 8 or 100-uvol-permeable membranes (La's, the Triis buffer solution of 0.18, 25-mM NaCl, and 3 hours using Centriferule (Amicon, Denver, MA) and Centricon (Amicon) of the cut-off molecular weight 10,000. Next, the buffer solution of iso form was exchanged to the sodium chloride of 0.1M by the gel filtration using Sephadex G-25 (Pharmacia). Isotonic focusing for analysis of five concentrated pools which those pools included the iso forms 4, 5, 6, 7, and 8. The iso form 4 is eluted as two or more bands, and this shows that this iso form was decomposed to some extent.

The 5th iso form preparation was corrected by adding a pre focusing pattern to a flattened isotonic-focusing procedure. In this correction, protein was not added as an ANHO light / urea / gel mixture before electrophoresis, but after creating pH indication in a gel bed, it added to isotonic-focusing equipment. The 2.25-4.5cm gel bed intercept was mixed with ejection and an erythropoietin solution from cathode after pre focusing for 75 minutes (at the titre of 1500 BU/RTU), and it returned to the gel bed. The iso forms 10, 11, 12, 13, and 14 were eluted from a gel bed after isotonic focusing, and the ultrafiltration using

A pre focusing phase in the correction added in order to make the ultraviolet-rays extraction property of an iso form erythropoietin object into the thing still weaker to the property of start recombination erythropoietin. Such amelioration of spectral characteristics appears as a with absorbance [of a isolation iso form] (280nm and 260nm) ratio in the case of the iso form acquired by the preparation objects 2 and 3 (pre focusing-using type), an average ratio (A280/A260) with an absorbance [of 280nm] and an absorbance of 260nm in 1.3x0.011, but in the case of the preparation objects 5 and 6 (pre focusing-using type), A280 / A260 ratio is 1.6x0.020, i.e., in-form 4 is excepted from comparison - the preparation objects 2 and 3 sits - as an average of [of the preparation objects 5 and 6] - A280 / A260 ratio is 1.3x0.011 and 1.7x0.019, respectively. (The iso form 14 exists by the minimal dose, therefore it is tended to interfere estimate amounts estimated by the ratio of the two absorbances, or, probably, has the most irregular spectrum by the reason closest to its electrode during the flattened isotonic-focusing procedure.) (It corrected so that Q-neqneque might be used as an anion exchange resin) It prepared according to Lai's and others example 2 - rearranging - as an average of [of erythropoietin] - A280 / A260 ratio is 1.91\*\*\*\*0.04.

like \*\*\*\* - the starting material of form preparation object 86 was a recombination erythropoietin preparation object including the iso forms 4-13. Pre focusing of the ANHO light was carried out within Rotofor equipment like the 4th preparation. The ANHO light fractionation which has the pH measurement values 3

## エリトロポエチンイソ形 シアル酸/エリトロポエチン

	(モル/モル)
イソ形 13	12.9±0.5
イソ形 12	11.8±0.2
イソ形 11	11.0±0.2
イソ形 10	9.8±0.3
イソ形 9	8.9±0.6
イソ形混合物(9~14)	11.3±0.2

**Example 3:** Activity of a recombinant erythropoietin iso form About the iso form that is isolated like the publication in the example 1, in order to measure the abundance of recombinant erythropoietin, it authorizes by the absence of 280nm, Bradford protein assay, and RIA for erythropoietin. Relative in vivo bioactivity is measured using the bioassay (Cotes (et al., Nature 191, 1065 (1961)) of the polypeptidic mouse (erythropoietic polycyclic mouse) which is not hypoxia. Since reduction of immunoreactive appearance arose in the iso form containing the steric acid of a large quantity, erythropoietin concentration was underestimated, therefore the relative in vivo specific activity of most electrophoretic iso forms was overestimated when the quantum of the abundance of erythropoietin protein was carried out using the radioimmunoassay for erythropoietin, in a certain kind of iso form, the value of relative in vivo specific activity higher than 100% was obtained. The relative in vivo specific activity of erythropoietin iso form is determined by the following formula:  $\text{Relative in vivo specific activity} = \frac{\text{Relative in vivo bioactivity}}{\text{Relative in vivo specific activity of erythropoietin iso form}} \times 100\%$ . The relative in vivo specific activity of erythropoietin iso form will be compared. Such specific activity is shown in a table 2.

In a table 2, "n" is the number of the iso form preparation objects according to individual need for measurement of a specific activity value. In many cases, two or more in vivo assays were carried out to each of an iso form preparation object. The specific activity of all three columns was calculated using the same in vivo data, and the unit / mg erythropoietin polypeptide was determined from the absence of 280nm, radio immuno ASSAIA \*\*, or a Bradford protein assay result. The purification recombinant erythropoietin containing the iso forms 9-14 and 15-16 of the recombinant erythropoietin polypeptide, since there were some iso forms that were not performing the bioassay, the abundance of erythropoietin polypeptide was determined using the Bradford protein assay, and the relative in vivo specific activity also have "n".

Lu et al. and the erythropoietin activity is refined by the same procedure of the publication and contains the name of the iso forms 9-14 and 15-16 as in Hatanaka and a criterion for its in vivo assay.

It can change into unit / A280 by carrying out the multiplication of erythropoietin polypeptide 0.807 mg/A280 to the relative specific activity expressed with the unit / mg erythropoietin polypeptide. This transform coefficient is erythropoietin polypeptide mg/A280 computed by carrying out the multiplication of the protein content (about 60% of the weight, Davis et al., Biochemistry 26, 2633 (1987)) of the erythropoietin glycoprotein to the absorbance index (1.345 mg/A280) of erythropoietin (nearly, erythropoietin 1.345 mg/A280 polypeptide 0.60mg/mg erythropoietin = polypeptide 0.807 mg/A280). Furthermore, specific

年次	昭和 26 年度 1951年度	昭和 27 年度 1952年度	昭和 28 年度 1953年度
1	219,400 千 1,100	205,800 千 77,700	356,700 千 15,900
2	267,400 千 30,100	238,700 千 19,500	377,200 千 40,200
3	275,200 千 52,600	258,400 千 41,700	397,700 千 42,600
4	282,100 千 41,100	335,800 千 57,300	263,400 千 42,700
5	325,900 千 1,900	170,300 千 41,300	171,900 千 11,600
6	485,900 千 3,000	96,400 千 44,700	113,400 千 19,600
7	464,300 千 5,000	70,400 千 4,100	61,000 千 1,500
8	464,300 千 700	50,300 千 1,800	42,800 千 5,400
9	464,300 千 700	18,300 千 1,800	15,500 千 1,400

The data of table 2 are shown also in the graph of drawing 2 A, drawing 2 B, drawing 2 C: these data – the relative in vivo activity of erythropoietin – is – increasing to form #11 as a function of a dialic acid content is shown. The iso forms 11-14 have the same relative in vivo bioactivity intradially. (This is very clear when the concentration of the iso form 14 is expressed using Bradford assay.) Probably, also the iso form 14, a Bradford value will be the most exact, it is because the result obtained is a low generally, so a reaction reduction of the above electrophoretic gels just gives most bioactivity in RIA differently as the relative bioactivity by A280. It will be because the reason all why the relative in vivo specific activity of an erythropoietin iso form is large probably more than less long so that there are many contents of a dialic acid the half-life in the blood flow of these forms. The indicator of the iso forms 9 and 13 was carried out by the method of Lind (1933), and the clearance rate in the inside of a rat was measured. The in vivo specific activity of an erythropoietin iso form is about 1000 IU/mg, and this was quite longer than the iso form 9.

**Example 2.** The relative in vivo bioactivity of erythropoietin iso forms 11-14 was determined according to the procedure of a publication to the above, and produced erythropoietins are condensed, and dialysis fractions is carried out to Tria of

10mM, and pH7.2. Protein concentration is measured by the Bradford micro protein assay using bovine serum albumin as a criterion. The bed volume 4cm (height) x 1.05cm (diameter) x 2.2cm column filled up with the Q-sepharose Fast Flow (Pharmacia) which set the 19.6ml solution containing the total 40mg protein to 20micromolar in CuSO<sub>4</sub>. Filtered with the filter with a cut-off size of 0.45 microns, and equilibrated by 4-degree C Tris of 10mM(pH) and pH 6.8-7.0 is filled up. After adding a sample, the same twice as many buffer solution as the capacity of column washes a column. The rate of flow of a column is a part for about 1ml. In order to choose predetermined erythropoietin iso form mixture, as columns according to individual which uses this procedure are prepared.

The 6 to 9 times as much low pH buffer solution as the capacity of column washes a column. The buffer solution consists of the acetic acid of 150mM(s) adjusted to pH4.7 by NaOH, the glycine of 1mM, and the urea of CuSO<sub>4</sub> 4 and 6M of 20micromolar in column #1. In column #2 it consists of the acetic acid of 200mM(s) adjusted to pH4.7 by NaOH, the glycine of 1mM, and the urea of CuSO<sub>4</sub> 4 and 6M of 20micromolar. In column #3 it consists of the acetic acid of 250mM(s) adjusted to pH4.7 by NaOH, the glycine of 1mM, and the urea of CuSO<sub>4</sub> 4 and 6M of 20micromolar. In column #4 it consists of the acetic acid of 300mM(s) adjusted to pH4.7 by NaOH, the glycine of 1mM, and the urea of CuSO<sub>4</sub> 4 and 6M of 20micromolar. In column #5 it consists of the acetic acid of 150mM(s), the glycine of 1mM, and the urea of CuSO<sub>4</sub> 4 and 6M of 20micromolar. In column #6 it consists of the acetic acid of 300mM(s), the glycine of 1mM, and the urea of CuSO<sub>4</sub> 4 and 6M of 20micromolar. Predetermined erythropoietin iso form mixture is made eluted from a column by washing by CuSO<sub>4</sub> and pH7.0 of Tris-HCl of 10mM(s), NaCl of 140mM, and 20micromolar.

The iso form pool eluted from each column is condensed, and a solvent is exchanged for water using Amicon/Centricon-10 minute-amount concentration equipment. The result of isoelectric focusing for analysis of these concentration pools is shown in drawing 3. The gel lanes 1-6 show the predetermined erythropoietin iso form mixture eluted from columns 1-6, respectively. The "iso form mixture" shown in the gel lane at the right end of drawing 3 shows the cell culture medium added by the above Q-sepharose columns.

The acetic acid of 5mM(s), the glycine of 1mM, and the urea of CuSO<sub>4</sub> 4 and 6M of 20micromolar wash a column, and erythropoietin iso form mixture is made eluted from a column using an above-mentioned procedure. Before hanging this eluted iso form mixture on isoelectric focusing for analysis, according to the procedure of a publication, it refers further to Lai et al. and the above.

Example 5: Fractionation of a recombinant erythropoietin iso form using the low pH incubation on Q-sepharose. In another procedure, as erythropoietin iso form is separated using the incubation of pH gradual decrease and ionic strength gradual increase. The erythropoietin content culture medium which condensed and carried out dialysis filtration is filled up with the rate of about 40mg of the total protein per gel 1ml into Q-sepharose column. Next, a column is washed by twice (about) as many Tris-HCl of 10mM(s) as the capacity of column, and pH7.0, subsequently the urea (pH 4.8) (about) of about 10 times as much CuSO<sub>4</sub> 4/6M of the glycine / 20micromolar of an acetic acid / 1mM of 2mM(s) as the capacity of column washes, and the erythropoietin iso form containing contamination protein and less than about seven nucleic-acid residue is removed. The iso form containing about eight pieces to about 12 nucleic acids is made eluted from a column using the incubation which leaves the acetic acid of about 2 mM(s) in the urea / 1CUSO<sub>4</sub> of the glycine / 20micromolar of 1mM of 6M, and reaches CuSO<sub>4</sub> [ of 40mM(s) ] (pH 4.8) of an acetic acid / 6M of the glycine / 20micromolar of a urea / 1mM. The total capacity of incubation is about 40 times the capacity of column, and collects each fractionation of the about 1 capacity of column in a container. This container has held the Tris buffer solution of sufficient amount which maintain pH in the range of 6-8.5, in order to prevent that the collected fractionation contains low [ pH ] for a long period of time. It acts as the monitor of the separation, covering the aliquot of fractionation over isoelectric focusing for analysis.

Drawing 4 shows separation of the iso forms 1-11 attained by this procedure. The iso forms 12-14 which combined with the column and were maintained at the termination of incubation are made eluted by washing with the buffer solution which consists of CuSO<sub>4</sub> (pH7.0) of Tris-HCl of 10mM, NaCl of 140mM, and 20mM. (It discontinued in incubation or was eluted with the sodium chloride solution) An iso form is sequentially processed with the reversed phase chromatography and gel filtration chromatography like a publication in Lai et al. and other example 2, and contamination protein is removed.

Example 6: Construction of a Homo sapiens erythropoietin analog. The location of the existing carbohydrate binding site inside a Homo sapiens erythropoietin amino acid sequence is shown in drawing 2 (SEQ ID NO:26). The production procedure of the additional glycosylation part of erythropoietin is summarized to drawing 6 A-C, and is explained below.

In order to use it for *in vitro* mutagenesis, the following oligonucleotide primers were compounded.

[Aas4-Ser6]EPO-5'GCGCCACCAAACTCGAGCTGTGACAGCGGAT' (SEQ ID NO:1)

[Aas4-Ser11]EPO-5'ATCTGTACACCAAGCTCGAGAGCT' (SEQ ID NO:2)

[Aas6]EPO-5'GCGGCTGGCCAACTGTCCGAGG' (SEQ ID NO:3)

[Aas124]EPO-5'TCCCTCCAGATAATGCTCAGCTGC' (SEQ ID NO:4)

[Aas125-Ser127]EPO-5'GAGATGCCAACTCATCTGCTCAGCT' (SEQ ID NO:5)

[Aas163-Ser165]EPO-5'GAGATGCCAACTCATCTGCTCAGCTGC' (SEQ ID NO:6)

[Thr12]EPO-5'TCCAGATGGCACTCAGCTGCTCT' (SEQ ID NO:7)

[Thr124, Thr125]EPO-5'TCCAGATGCCAACTCAGCTGCTCT' (SEQ ID NO:8)

The codes which attached the underline shows the summable positive region where wild type amino acid was permuted with the amino acid in a parenthesis.

In order to add N-glycosylation part to Aas4, Aas6 and [Ser6] EPO were built. In order to add N-glycosylation part to Aas9, Aas9 and [Ser11] EPO were built. [Aas69] EPO was built in order to add N-glycosylation part to Aas69. In order to add N-glycosylation part to Aas125, Aas125 and [Ser127] EPO were built. In order to add O-glycosylation part to Thr125, Thr125 EPO, and Thr124 and Thr125 EPO were built.

In order to use it for *in vitro* mutagenesis, the following oligonucleotide primers were compounded.

[Ser6-Aas9, Thr11]EPO-5'GCGGCTGGCCAACTCGAGAGAACTGCTCT' (SEQ ID NO:9)

[Aas125, Thr127]EPO-5'GAGATGCCAACTCATCTGCTCAGCTGC' (SEQ ID NO:10)

[Aas125, Thr127, Thr131]EPO-5'ATGCGAACTCAACGCTCCTCACTCAACAATCACTCT' (SEQ ID NO:12)

[Thr124, Aas125, Ser127]EPO-5'GAGATGCCAACTCATCTGCTCAGCTCT' (SEQ ID NO:13)

[Thr124, Aas125, Thr127]EPO-5'GAGATGCCAACTCATCTGCTCAGCTCT' (SEQ ID NO:14)

[Thr125, Thr126]EPO-5'GAGATGCCAACTCATCTGCTCAGCTCT' (SEQ ID NO:15)

Pro124, Thr125, Thr126, and [Thr131] EPO: Pro124 and [Thr131] EPO cDNA are left, oligonucleotide primer 5'AGATCGACCAACCGCTGCTCAGCT' (SEQ ID NO:16) is used, and Pro124, Thr125, and [Thr126] EPO are produced. Next, oligonucleotide primer 5'TGCTCCACTCAACAATCACTGCT' (SEQ ID:17) is used, and Pro124, Thr125, Thr126, and [Thr131] EPO are produced.

In order to add N-glycosylation part to Aas69 and to strengthen N-glycosylation of this part, Aas69, [Thr71] EPO, and Ser68, Aas69 and [Thr71] EPO are built. In order to add N-glycosylation part to Aas125 and to strengthen the glycosylation of this part, Thr125, [Thr126] EPO, and Pro124, Thr125, Thr126 and [Ser131] EPO are built.

In the source of the erythropoietin DNA for *in vitro* mutagenesis was a Homo sapiens erythropoietin cDNA clone in plasmid pUC1 (Ha13) (Law et al., Proc Natl Acad Sci. 69:20 (1986)). The plasmid DNA of the origin was digested with BamHI and a BglII restriction enzyme to Ha13, the obtained DNA fragment was applied to agarose gel electrophoresis, and the erythropoietin DNA fragment of 810 base pair (bp) was isolated from gel using the procedure (Bio 101, Inc.) in which it was provided by the GeneCleanTM kit and the manufacturer. Plasmid pBR322-EPO is included as BamHI fragmentation in which the erythropoietin genome gene was inserted by the derivative of pBR322 as indicated by a Lin patent and the above. Similarly pBR322-EPO was digested by BamHI and BglII, and the vector fragmentation of 6517bp was collected. Two fragmentations were combined and KGT1 was obtained. In order to build pEC-1, pDSVL (Y. Iizumi et al. a Lin patent and the above at a publication and drawing 5 B) was digested by BamHI, and the isolated DNA fragment of 72 of the origin and 8 kbases (kb) was combined with KGT1 of erythropoietin cDNA content KGT1.

In order to produce the single stranded DNA for *in vitro* mutagenesis, pEC-1 was digested by BamHI and BglII and the erythropoietin cDNA fragmentation of 820bp was isolated. This fragmentation was combined with the BamHI part of m13mp18, and m13-EC-1 was produced. Kamid et al., Methods in Enzymol. 154:367 (1987) and Manning and Methods in Enzymol. - single stranded DNAs were collected from the supernatant liquid of 1032 shares of Escherichia coli RZ infected with m13-EC-1 in the procedure indicated by 101 and 20 (1983). In *in vitro* mutagenesis, the single stranded DNA of about 1micromol and one of the above-mentioned synthetic primers of 0.2 picomoles were mixed with the buffer solution (MgCl<sub>2</sub> of Tris of 250mM, pH7.8, and 50mM, and dithiothreitol of 50mM(s)) of 0.05mM. In order to carry out annealing of the primer to mold, reaction capacity was adjusted to 10micromol with water, and at 65 degrees C, mixture was heated for 5 minutes and, subsequently was cooled gradually to the room temperature.

Because of an expanding reaction, they are dTTP of 2.5micromol, dATP, dGTP, and ATP (all 10micromol). It adds and, subsequently they are the Escherichia coli DNA polymerase (Klenow fragmentation) of 1micromol (one unit), and T four of 1micromol (one unit). The DNA ligase was added. Next, overnight incubation was carried out at 14 degrees C, and mixture was used for the transformation of Escherichia coli JM 109 (Y. Iizumi-Person et al. J. Gen. 33:103 (1985)) in the indicated procedure (Manning, above).

In order to identify a mutation clone by the hybridization for discrimination, the plaque on nutrient agar was moved to the Gene Screen filter (New England Nuclear). The filter was dried under the heat lamp and, subsequently it incubated at 60 degrees C in 6xSSC of 1%SDS content for 1 hour. For hybridization, the above-mentioned oligonucleotide primer (single picomoles) Aa and indicator is carried out with T-four polynucleotide kinase and the gamma-32P-indicator ATP. With a filter in 6xSSC, 0.5%SDS, and the 100mg / ml salmon sperm DNA for [Aas124] mutation, for 37 degrees C, and Aas4 and [Ser6] mutation, 55 degrees C, for [Thr125], and Pro124 and [Thr125] mutation, overnight incubation was carried out at 70 degrees C at 65-degrees-C for [Aas9, Ser11], and Aas163 and [Ser165] mutation. On the next day, by 6xSSC, the filter was washed 3 times at the room temperature, and was covered over autoradiography, the hybridization to the plaque which has a wild type erythropoietin cDNA array in being required - most - or the filter was washed in 6xSSC, mixing temperature until it was no longer detected at all. The clone which gave the hybridization signal electropositive in the bottom of these conditions was identified, and in order to isolate a pure clone, JM109 was transfected again. Deoxy chain termination sequence analysis showed that the mutation to an asparagine, a serine, a threonine, and proline residues existed.

Double strand m13-EC-1 DNA including [Aas4, Ser6], [Aas9, Ser11], Aas69, [Aas124], [Aas125], [Ser127], [Aas163], Ser165, [Thr125] and variation as shown in [Pro124, Thr125] was collected from transfection JM109 cell by the boiling method (Holmes et al. and Anal Biochem 117:193 (1981)). DNA was digested by BamHI and XhoI and the erythropoietin DNA fragment of 810bp was isolated. pEC-1 was digested by BamHI, subsequently, partial digestion was carried out by BglII and indirect demethylation phosphorylation of the five prime end of the obtained fragmentation was carried out at 60 degrees C by the bacterial alkaline phosphatase in 10Tris of mM and pH8 for 60 minutes. The BstEII-BglII fragmentation of 810bp(s) isolated the vector fragmentation of 72bp which carry out deletion, and combined with the above-mentioned erythropoietin fragmentation. The obtained plasmid (pEC-X, and naming and this X are an analog number) contains DNA which carries out the code of the erythropoietin analog which has variation amino acid residue in the specified location.

On the erythropoietin analog (pEC34) was built by the *in vitro* mutagenesis to which deletion of the amino acid residue 41-55 is carried out. As this result, smaller EPO content BamHI-BglII fragmentation (775bp) was obtained. This fragmentation was inserted in pEC1 as mentioned above. In order to carry out cloning of the erythropoietin analog, pEC34 was digested by BamHI as mentioned above, by BglII, partial digestion was carried out, dephosphorylation was carried out, and the vector was isolated. Next, the vector fragmentation of 72bp was combined with the above-mentioned erythropoietin fragmentation. Recombinant and more re-cloned can be easily identified by carrying out cloning with pEC34. In re-cloned, BamHI-BglII fragmentation smaller than an analog arises, and these are easy to identify on agarose gel.

The erythropoietin analog shown in tables 3, 4, and 5 using these general procedures was built. DNA array variation is shown for every analog. Moreover, the oligonucleotide primer used for mutagenesis had the array of a complementarity in the array of Homo sapiens erythropoietin.

表 3  
エリトポエチン類似体

部位 No.	7 1 / 変換	変換後
N1	Aas4-Ser6	CCC-AAC
		ATC-AGC
N2	Aas4-Ser11	AGC-AAC
		ATC-AGC
N3	Aas9-Thr21	CCC-AAC
		GAG-ACG
N4	Aas39-Thr32	GCT-AAT
		CAC-ACG
N5	Aas42	CCA-AAT
		CCA-ATC
N6	Ser42-Aas43-Thr45	CCA-ATC
		AAA-ACT
N7	Ser49	TAT-TCT
N8	Aas51-Thr53	TGG-AAT
		AGG-ACG
N9	Aas57-Thr59	GCG-AAC
		CTG-AAC
N10	Aas59	CTG-AAC
N11	Aas61-Thr71	CTG-AAC
		CTG-AAC
N12	Ser68-Aas69-Thr71	N11 plus
		GCT-TTC
N13	Aas89-Thr96	TGG-AAT
		GCT-TTC
N14	Ser97-Aas98-Thr98	N13 plus
		CGG-TTC
N15	Ser97-Aas98-Thr98-Thr97	N14 plus
		CAG-ACG

表 3 (続9)  
N結合糖水化糖鎖部位を有する  
エリトロポエチン類似体

糖鎖位 No.	アミノ酸置換	配列置換
W16	Ser47Asn55Thr56Val56	W16 plus AGC→AGC
W17	Asn58Ser59	TGG→AAAT
W18	Val57Asn58Thr59	CCC→TCC CCG→GTG TGG→AAAT
W19	Ser47Asn58Gly59Thr59	CCC→AAC CCG→TCC TGG→AAAT GAG→GGG
W20	Asn57Ile59Thr59	CCC→AAC GAG→AAC CCC→ATC CTG→AAC
W21	Ser47Asn57Ile59Thr59	W20 plus CCG→TCC GCA→AAC
W22	Asn57Thr55	CCG→AAC CAG→AGC
W23	Asn56Val55	CCC→AAC CCT→GTT
W24	Asn55Ser55Thr55	CCT→AAAT CCA→TCA GAT→ACT
W25	Asn55	CCG→AAAT
W26	Ser55Asn55	CCA→TCA CCG→AAC
W27	Asn55Ser57	CCC→AAC GCT→TCT
W28	Asn55Thr57	CCC→AAC GCT→AGC

表 3 (続9)  
N結合糖水化糖鎖部位を有する  
エリトロポエチン類似体

糖鎖位 No.	アミノ酸置換	配列置換
W29	Leu51Ser52Asn53Thr53	W28 plus CCT→CTT CCA→TCA
W30	Thr52Gly52Leu53Asn53Thr57	W28 plus TCC→AAC CCG→GGG GAT→CTC
W31	Asn54Ser55	TCA→AAAT GCT→TCT
W32	Asn56Thr56Val55	TCA→AAAT GCT→ACT CCA→GTA
W33	Leu52Ser53Asn53Thr56Val55	W32 plus CCT→CTT CCA→TCA
W34	Thr52Gly52Ser55Asn56Thr56Val55	W32 plus CCT→AGC GAT→GGG GCC→TCC CCA→AGC
W35	Ser55Asn56	CTC→AAC
W36	Asn55	ACA→AAC
W37	Asn54Thr56	ACT→AAAT GAC→ACC
W38	Asn55	GCT→AAAT
W39	Asn56Thr56	GAC→AAC
W40	Asn57Thr59	TTC→AGC ACT→AAAT CCC→AAC
W41	Asn58Thr59	TTC→AAC AAA→ACA

表 3 (続9)  
N結合糖水化糖鎖部位を有する  
エリトロポエチン類似体

糖鎖位 No.	アミノ酸置換	配列置換
W42	Asn54	CTC→AAC
W43	Ser43Thr44Val55	TTC→TCC CTC→AGC CCG→GTG TTC→GGC
W44	Gly54Thr49	CTC→AAC
W45	Asn55	CTG→AAAT
W46	Asn56Ser55	ACA→AAAT
W47	Asn56Thr56Val57Asn58Thr59	W4 and W18
W48	Asn58Thr57Ser57Asn58Thr59	W13 and W14

表 4  
O結合糖水化糖鎖部位を有する  
エリトロポエチン類似体

糖鎖位 No.	アミノ酸置換	配列置換
O1	Ser5	ATC→AGC
O2	Ser7	TGT→TCC
O3	Ser8	GAC→AGC
O4	Ser11	CTC→TCT
O5	Ser19	GAG→TCC
O6	Ser23	GAG→TCC
O7	Ser29	TGT→AGC
O8	Ser29	TGT→TCT
O9	Ser30	GCT→TCT
O10	Ser33	TGC→TCA
O11	Ser37	GAG→TCC
O12	Ser39	TAT→TCT
O13	Ser41	GTA→TCA
O14	Ser43	CTC→TCC
O15	Ser47	CTG→TCC
O16	Ser48	CCC→TCC
O17	Ser50	CTG→TCC
O18	Ser53	GCT→TCT
O19	Ser54	CTC→TCT
O20	Ser58	CTG→TCC
O21	Ser59	CCC→TCC
O22	Ser61	TTC→TCC
O23	Ser64	CAG→TCC
O24	Ser67	CCG→TCC
O25	Ser69	CTG→TCC
O26	Ser69	CCC→TCC
O27	Ser69	CTC→TCC
O28	Ser100	CTT→TCT
O29	Ser100	CCC→AGT

表 4 (続表)  
O結合型水酸化糖鎖部位を有する  
エリトロポエチン類似体

類似体 No.	アミノ酸置換	配列変異
030	Ser189	CTC→ACC
031	Ser189	CYT→TCT
032	Ser111	GCT→TCT
033	Ser112	CTG→TGG
034	Ser114	GCC→TCC
035	Ser128	GCT→TCT
036	Ser189	TGG→GAG
037	Ser101	TGC→TCC
038	Pro129Ser127	GCC→CCC
		GCT→TCT
039	Thr42	GAA→ACA
040	Thr44	TGG→ACG
041	Thr45	CAG→ACG
042	Thr48	TGG→ACG
043	Thr49	CCC→ACC
044	Thr42	CAG→ACG
045	Thr100	AGT→ACT
046	Thr110	CGC→ACG
047	Thr113	CAG→ACG
048	Thr123	GAT→ACT
049	Thr126	GCC→ACC
050	Thr126	GCC→ACC
051	Thr129Ser127	GCT→TCT
		GCC→ACA
052	Thr129Thr128	TCA→ACA
		TCA→ACC
053	Thr128	GCT→ACT
054	Thr127	CTC→ACC
055	Thr128	

表 4 (続表)  
O結合型水酸化糖鎖部位を有する  
エリトロポエチン類似体

類似体 No.	アミノ酸置換	配列変異
056	Thr121	CGA→ACA
057	Thr126	GAC→ACC
058	Thr140	AAA→ACA
059	Pro124Thr123	GCG→CCG
		GCC→ACC
060	Pro124Thr125Thr126	059 plus
		TCA→ACC
061	Pro124Thr125Thr126Thr121	060 plus
		CGA→ACA
062	ECG C-末端延長部	

表 5

H-結合及びO-結合型水酸化糖鎖部位を有するエリトロポエチン類

類似体

類似体番号	アミノ酸置換	配列変異
N01	Ser**Asn**Thr**	N14及び062
	ECG C-末端延長部	
N02	Asn**Thr**Val**Asn**Thr**	N47及び062
	ECG C-末端延長部	

The plasmid named pDEC-X (X is an analog number) was built by inserting Erythropoietin cDNA in pDECdelta which is the derivative of plasmid pDSalphi2. Expression vector pDSalphi2 are outlined by PCT patent application No. WO 90/14363. pDECdelta was guided by the following phrases from pDSalphi2. (1) Deletion of the HindIII part of pDSalphi2 was carried out by digesting DNA of pDSalphi2 by HindIII, processing a HindIII cohesive end by the DNA polymerase (Klenow fragmentation) and dNTP of Escherichia coli, and recombining a flush-end-ized vector. The obtained plasmid was pDSalphi2deltaH. (2) pDSalphi2deltaH was digested by SalI and the synthetic oligonucleotide which has an SV40 splice signal with the SalI linker combined at 3' edge of a splice signal was combined with this. The synthetic oligonucleotide had the following arrays (SEQ ID.NO:18).

5'-

TGCGAGGAACGTAAAGAACAGAGTAACTGGAAGTTAGTCTTTTGTCTTTTATTCAGGTCGCGATCCGCGTGGTGGTGCAGAAATCAAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCCTTACTTCTAGCCCTGTACGGAAGTGTACTTCTGCTCTAAAGCTGCTGCAACAAAGCTGGTCGACCT

- the obtained plasmid was a pDSalphi2deltaH splice.

(3) Digest a pDSalphi2deltaH splice by SalI and it is T four. It flush-end-ized by processing a cohesive end by DNA polymerase and dNTP. BamHI-BglII Homo sapiens erythropoietin cDNA fragmentation of 820bp(s) was flush-end-ized by the same approach, and it combined with the plasmid. The obtained plasmid was pDEC-1.

(4) pDEC was digested by KpnI and PvuII and it flush-end-ized by processing a cohesive end by using blunt end. In order to carry out deletion of the excised KpnI-PvuII fragmentation, the plasmid was made to recombine and plasmid pDECdelta was obtained. The pDEC-X plasmid was produced from pDECdelta by carrying out full digestion by BstEII and subsequently carrying out partial digestion by BglII. The vector fragmentation in which the erythropoietin coding array carried out deletion was isolated, and it combined with the BstEII-BglII fragmentation of 810bp(s) containing a desired plasmid.

Construction of some analogs which have two or more amino acid variation is explained below at a detail.

Construction of pDEC (N47) and pDEC (N48) pDEC (N47) containing aa30 del27 val87 aa88 and the90 mutation was built from pDEC (N18) and pDEC (N4) pDEC (N18) was digested by HindIII and BglII, and the fragmentation of 445bp was isolated. pDEC (N4) was digested by BstEII and HindIII, and the fragmentation of 377bp was isolated. Such two fragmentation was combined with pDECdelta cut by BstEII and BglII as mentioned above, and pDEC (N47) was obtained.

pDEC (N48) containing aa69 del71 ser87 aa83 and the90 mutation was built from pDEC (N14) and pDEC (N11). pDEC (N14) was digested by HindIII and BglII, and the fragmentation of 445bp was isolated. pDEC (N11) was digested by BstEII and HindIII, and the fragmentation of 377bp was isolated. Such two fragmentation was combined with pDECdelta cut by BstEII and BglII as mentioned above, and pDEC (N48) was obtained.

AH

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平8-506023

(43) 公表日 平成8年(1996)7月2日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	FI
C 1 2 N 15/09	ZNA		
A 6 1 K 38/22	ACC		
C 0 7 H 21/04		B 8615-4C	
		9281-4B	C 1 2 N 15/00
		7729-4B	5/00
			ZNA A
			B

審査請求 有      予備審査請求 未請求(全 94 頁)      最終頁に続く

(21) 出願番号      特願平7-507153  
 (86) (22) 出願日      平成6年(1994)8月16日  
 (85) 翻訳文提出日      平成7年(1995)4月14日  
 (86) 国際出願番号      PCT/US94/09257  
 (87) 国際公開番号      WO95/05465  
 (87) 国際公開日      平成7年(1995)2月23日  
 (31) 優先権主張番号      08/108, 016  
 (32) 優先日      1993年8月17日  
 (33) 優先権主張国      米国 (US)

(71) 出願人      アムジエン・インコーポレーテッド  
                   アメリカ合衆国、カリフォルニア・91320  
                   -1789、サウザンド・オークス、デハビル  
                   ランド・ドライブ・1840、アムジエン・セ  
                   ンター  
 (72) 発明者      エリオット、ステイブン・ジー  
                   アメリカ合衆国、カリフォルニア・91320、  
                   ニューベリー・パーク、ゴールデン・クレ  
                   スト・1040  
 (74) 代理人      弁理士 川口 義雄 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】      エリトロボエチン類似体

(57) 【要約】

少なくとも1つの付加的グリコシレーション部位または  
 少なくとも1つのグリコシレーション部位の転位を有す  
 るエリトロボエチン類似体が開示されている。本発明は  
 また、該エリトロボエチン類似体をコードするDNA配  
 列、並びに類似体発現用の組換えプラスミド及び宿主細  
 胞に関する。



## 【特許請求の範囲】

1. 少なくとも 1 つの付加的グリコシレーション部位を含むアミノ酸配列から成るヒトエリトロポエチン類似体。
2. グリコシレーション部位がN-結合炭水化物鎖用の部位であることを特徴とする請求項 1 に記載の類似体。
3. グリコシレーション部位がO-結合炭水化物鎖用の部位であることを特徴とする請求項 1 に記載の類似体。
4. それ自体に結合した少なくとも 1 つの付加的炭水化物鎖を有する請求項 1 に記載の類似体。
5. 炭水化物鎖がN-結合炭水化物鎖であることを特徴とする請求項 4 に記載の類似体。
6. 炭水化物鎖がO-結合炭水化物鎖であることを特徴とする請求項 4 に記載の類似体。
7. 外因性DNA配列の発現産物であることを特徴とする請求項 1 に記載の類似体。
8. ヒトエリトロポエチンのアミノ酸配列の30、51、57、69、88、89、136または138位のいずれかの位置にアスパラギン残基が置換していることを特徴とする請求項 2 に記載の類似体。
9. ヒトエリトロポエチンのアミノ酸配列の125位にセリンまたはトレオニン残基が置換していることを特徴とする請求項 3 に記載の類似体。
10. Asn<sup>30</sup> Thr<sup>32</sup> EPO ;  
Asn<sup>51</sup> Thr<sup>53</sup> EPO ;  
Asn<sup>57</sup> Thr<sup>59</sup> EPO ;  
Asn<sup>69</sup> EPO ;  
Asn<sup>69</sup> Thr<sup>71</sup> EPO ;  
Ser<sup>68</sup> Asn<sup>69</sup> Thr<sup>71</sup> EPO ;  
Val<sup>87</sup> Asn<sup>88</sup> Thr<sup>90</sup> EPO ;

Ser<sup>87</sup> Asn<sup>88</sup> Thr<sup>90</sup> EPO ;  
 Ser<sup>87</sup> Asn<sup>88</sup> Gly<sup>89</sup> Thr<sup>90</sup> EPO ;  
 Ser<sup>87</sup> Asn<sup>88</sup> Thr<sup>90</sup> Thr<sup>92</sup> EPO ;  
 Ser<sup>87</sup> Asn<sup>88</sup> Thr<sup>90</sup> Ala<sup>162</sup> EPO ;  
 Asn<sup>69</sup> Thr<sup>71</sup> Ser<sup>87</sup> Asn<sup>88</sup> Thr<sup>90</sup> EPO ;  
 Asn<sup>30</sup> Thr<sup>32</sup> Val<sup>87</sup> Asn<sup>88</sup> Thr<sup>90</sup> EPO ;  
 Asn<sup>89</sup> Ile<sup>90</sup> Thr<sup>91</sup> EPO ;  
 Ser<sup>87</sup> Asn<sup>89</sup> Ile<sup>90</sup> Thr<sup>91</sup> EPO ;  
 Asn<sup>136</sup> Thr<sup>138</sup> EPO ;  
 Asn<sup>138</sup> Thr<sup>140</sup> EPO ;  
 Thr<sup>125</sup> EPO ; 及び

Pro<sup>124</sup> Thr<sup>125</sup> EPO

から成るグループから選択されるヒトエリトロポエチン類似体。

11. エリトロポエチンのカルボキシ末端に1つまたはそれ以上のアミノ酸から成る付加体を含んでおり、前記付加体が少なくとも1つのグリコシレーション部位を有していることを特徴とする類似体。

12. 付加体が、ヒト絨毛性ゴナドトロピンのカルボキシ末端に由来のペプチドフラグメントから成ることを特徴とする請求項11に記載の類似体。

13. (a) カルボキシ末端から伸びるアミノ酸配列Ser-Ser-Ser-Ser-Lys-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Leu-Pro-Ser-Pro-Ser-Arg-Leu-Pro-Gly-Pro-Ser-Asp-Thr-Pro-Ile-Leu-Pro-Glnを有するヒトエリトロポエチンと、

(b) 更にSer<sup>87</sup> Asn<sup>88</sup> Thr<sup>90</sup> EPOを含む前記 (a) の類似体と、

(c) 更にAsn<sup>30</sup> Thr<sup>32</sup> Val<sup>87</sup> Asn<sup>88</sup> Thr<sup>90</sup> EPOを含む前記 (a) の類似体と、

から成るグループから選択される請求項12に記載の類似体。

14. 少なくとも1つのグリコシレーション部位の転位を含むアミノ酸配列から成るヒトエリトロポエチン類似体。

15. 転位が、ヒトエリトロポエチンのN-結合炭水化物部位のいずれかの欠失及び

ヒトエリトロポエチンのアミノ酸配列の88位のN-結合炭水化物部位の付加から成ることを特徴とする請求項14に記載の類似体。

16. Gln<sup>24</sup> Ser<sup>87</sup> Asn<sup>88</sup> Thr<sup>90</sup> EPO ;

Gln<sup>38</sup> Ser<sup>87</sup> Asn<sup>88</sup> Thr<sup>90</sup> EPO ; 及び

Gln<sup>83</sup> Ser<sup>87</sup> Asn<sup>88</sup> Thr<sup>90</sup> EPO ;

から成るグループから選択される請求項15に記載の類似体。

17. 少なくとも1つの付加的グリコシレーション部位を含むヒトエリトロポエチン類似体をコードするDNA配列。

18. 請求項10に記載のヒトエリトロポエチン類似体をコードするDNA配列。

19. 少なくとも1つのグリコシレーション部位の転位を有するヒトエリトロポエチン類似体をコードするDNA配列。

20. 請求項16に記載のヒトエリトロポエチン類似体をコードするDNA配列。

21. 請求項13に記載のヒトエリトロポエチン類似体をコードするDNA配列。

22. 宿主細胞がヒトエリトロポエチン類似体を発現できるように請求項17または19に記載のDNA配列でトランスフェ

クトした真核性宿主細胞。

23. 治療有効量の請求項1、10、11または14のいずれか一項に記載のエリトロポエチン類似体を、医薬として許容される希釈剤、アジュバントまたは担体と共に含む組成物。

## 【発明の詳細な説明】

エリトロポエチン類似体

本発明は1992年9月8日出願の米国特許出願第07/942,126号の一部継続出願である。本発明は、少なくとも1つのグリコシレーション部位の付加または少なくとも1つのグリコシレーション部位の転位を有するエリトロポエチン類似体に関する。本発明はまた、該エリトロポエチン類似体をコードするDNA配列、並びに、類似体発現用組換えプラスミド及び宿主細胞に関する。

発明の背景

エリトロポエチン (EPO) は、赤血球系前駆細胞から赤血球への成熟に関与する糖タンパク質ホルモンである。エリトロポエチンは、血流中の赤血球のレベル調節に必須である。天然産生エリトロポエチンは、胎内期の肝臓及び成人の腎臓によって産生され、血液中を循環し、骨髓で赤血球の産生を刺激する。貧血の原因はほとんど例外なく腎不全であり、腎臓からのエリトロポエチンの産生が低下する。エリトロポエチンをコードする遺伝子で形質転換した宿主細胞にタンパク質産物を発現させる遺伝子工学技術によって産生された組換えエリトロポエチンが、慢性腎不全を原因とする貧血の治療に使用されたときに有効であることが

知見されている。

通常はヒト尿中に低レベルのエリトロポエチンが存在しているが、再生不能性貧血患者では高レベルの尿エリトロポエチンが検出される。Miyakeら、J. Biol. Chem., 252, 5558 (1977) は、ヒト尿エリトロポエチンを精製するために再生不能性患者の尿を出発物質として使用した。しかしながら今日まで、尿エリトロポエチンが治療的に有効であると証明されたことはない。

エリトロポエチンをコードする遺伝子の同定、クローニング及び発現は、Linの米国特許第4,703,008号に記載されている。該特許の記載内容は本明細書に含まれるものとする。Laiらの米国特許第4,667,016号は、細胞培地から組換えエリトロポエチンを精製する方法に関する記載を含んでいる。組換えプラスミド上のエリトロポエチン遺伝子を含む哺乳類宿主細胞に生物活性組換えエリトロポエチンを発現させこれを回収することによって、治療用途に適した量のエリトロポエ

チンが初めて入手可能になった。更に、遺伝子配列が解明され、精製タンパク質をより多量に入手することが可能になったので、このタンパク質の作用機序もいっそうよく判ってきた。

真核細胞によって産生される多くの細胞表面タンパク質及び分泌タンパク質は1つまたはそれ以上のオリゴ糖基によって修飾される。グリコシレーションと呼ばれるこの修飾は、タンパク質の物性に著明な影響を与え、また、タンパク質の安定、分泌に重要であり、タンパク質の細胞内局在 (subcellular localization) にも重要である。適正なグリコシレーションは生物活性に不可欠である。実際、真核生物のある種の遺伝子は、細胞性タンパク質グリコシレーションプロセスをもたない細菌 (例えば大腸菌) 中で発現されたとき、タンパク質を産生するが、このタンパク質は、グリコシレーション欠如が原因で活性を殆どまたは全く有することなく回収される。

グリコシレーションは、ポリペプチド主鎖に沿った特定位置に生じ、通常は2つの型、即ちO-結合及びN-結合に分類される。配列Asn-X-Ser/Thr (式中、Xはプロリン以外の任意のアミノ酸を示し得る) の一部を形成するとき、O-結合オリゴ糖はセリンまたはトレオニン残基に結合し、N-結合オリゴ糖はアスパラギン残基に結合する。N-結合オリゴ糖とO-結合オリゴ糖との構造並びに各結合中で観察される糖残基は異なっている。双方に共通に観察される1種類の

糖はN-アセチルノイラミン酸 (本文中では以後シアル酸と呼ぶ) である。シアル酸は通常は、N-結合オリゴ糖及びO-結合オリゴ糖の双方の末端残基であり、負電荷を有することによって糖タンパク質に酸性を与え得る。

ヒト尿由来エリトロポエチン及びヒトエリトロポエチンのアミノ酸配列1-165を有する組換えエリトロポエチン (哺乳類細胞中で発現) の双方は、3つのN-結合オリゴ糖鎖と1つのO-結合オリゴ糖鎖とを含んでおり、これらの鎖は合計で糖タンパク質の総分子量の約40%を構成している。N-結合糖タンパク質は、24、38及び83位のアスパラギン残基に生じ、O-結合糖タンパク質は126位のセリン残基に生じる (Laiら、J. Biol. Chem. 261, 3116 (1986) ; Broudyら、Arch. Bioch

em. Biophys. 265, 329 (1988) )。オリゴ糖鎖は、末端シアル酸残基によって修飾されることが判明した。シアル酸残基を完全に除去するためにグリコシル化エリトロポエチンを酵素処理すると、in vivo活性は低下するがin vitro活性は影響を受けない (Lowyら、Nature 185, 102 (1960) ; Goldwasserら、J. Biol. Chem. 249, 4202 (1974) )。この挙動は、肝臓のアシアログリコプロテイン結合タンパク質との相互作用によってアシアロエリトロポエチンが血流

から速やかに除去されるためであると説明されている (Morrellら、J. Biol. Chem. 243, 155 (1968) ; Briggsら、Am. J. Physiol. 227, 1385 (1974) ; Ashwellら、Methods Enzymol 150, 287 (1978) )。従って、エリトロポエチンは、肝臓の結合タンパク質との結合を阻害するようにシアル化されたときのみin vivo生物活性を有している。

エリトロポエチンのオリゴ糖鎖中のその他の成分の役割は十分には解明されていない。部分的に脱グリコシル化されたエリトロポエチンはグリコシル化形態に比較するとin vivo活性が顕著に低下しているがin vitro活性を維持していることが判明した (Dordalら、Endocrinology 116, 2293 (1985) ; Lin特許、前出)。しかしながら別の研究によれば、グリコシレーション部位であるアスパラギンまたはセリン残基の突然変異誘発によってN-結合オリゴ糖鎖またはO-結合オリゴ糖鎖を単独でまたは一緒に除去すると、哺乳類細胞中で産生された変異エリトロポエチンのin vitro活性が急激に低下する (Dubeら、J. Biol. Chem. 263, 17516 (1988) )。

エリトロポエチンのような糖タンパク質は、等電点電気泳動 (IEF) のような技術を用いて種々の荷電形態に分離さ

れ得る。いくつかの研究グループは、粗エリトロポエチン調製物及び部分精製エリトロポエチン調製物のIEF試験を報告している (Lukowskyら、J. Biochem 50, 909 (1972) ; Sheltonら、Biochem. Med. 12, 45 (1975) ; Fuhrら、Biochem. Biophys. Res. Comm. 98, 930 (1981) )。これらの研究では、IEFによって識別されたエリトロポエチン活性分画はせいぜい3つか4つであり、どの分画も炭水化

物含量に関する特性は決定されなかった。更に、分画の等電点とそれらの生物活性との相関関係も全く説明されなかった。

Miyakeら、前出、に記載されたヒト尿由来の尿エリトロポエチンの精製中に、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーから得られた2つのエリトロポエチン分画、即ち分画II及び分画IIIAが同様の比活性を有することが報告された。分画II及び分画IIIAに関するその後の炭水化物分析では、分画IIが分画IIIAよりも大きい平均シアル酸含量を有することが判明した (Dordalら、前出)。

本発明の1つの目的は、所定のシアル酸含量及び生物活性を有するエリトロポエチンの分離及び単離されたイソ形 (isoform) を提供することである。かかる分子を含有する医薬組成物は治療的にも有益であろう。

#### 発明の概要

本発明は、少なくとも1つの付加的グリコシレーション部位を含むアミノ酸配列から成るヒトエリトロポエチン類似体に関する。該類似体は、グリコシレーション部位が付加された結果として、ヒトエリトロポエチンよりも多数の炭水化物鎖を有し高いシアル酸含量を有している。本発明はまた、少なくとも1つのグリコシレーション部位の転位を含むアミノ酸配列から成るエリトロポエチン類似体を提供する。また、エリトロポエチンのカルボキシ末端に1つまたはそれ以上のアミノ酸から成る付加部を有しこの付加部が少なくとも1つのグリコシレーション部位を提供するような類似体も本発明に包含される。本発明は更に、かかるエリトロポエチン類似体をコードするDNA配列、並びに、類似体を発現させる組換えプラスミド及び宿主細胞を包含する。

#### 図面の簡単な説明

図1は、個々の組換えエリトロポエチンイソ形の分析用等電点電気泳動ゲルを示す。ゲルレーン1~11は、レーン1の低酸性 (高pI) からレーン11の高酸性 (低pI) までのイソ形を示す。また、イソ形9~14の混合物を含む精製組換えエ

リトロポエチンをゲルの左端及び右端のレーンに示す。

図2は、各エリトロポエチンイソ形のシアル酸の数と各イソ形のin vivo比活

性との関係を、エリトロポエチンポリペプチド1mgあたりの単位 (units) で示す。図2Aでは、各エリトロポエチンイソ形の濃度を、Bradfordタンパク質アッセイによって測定した。図2Bでは、濃度を280nmの吸光度によって測定し、図2Cでは、濃度をRIAによって測定した。

図3は、種々の条件下のアニオン交換クロマトグラフィーによって調製した組換えエリトロポエチンイソ形の所定の混合物の分析用等電点電気泳動ゲルを示す。ゲルレーン1～6の各々は、150mMの酢酸、pH4.7、150mMの酢酸（非緩衝）、200mMの酢酸、pH4.7、250mMの酢酸、pH4.7、300mMの酢酸、pH4.7または300mMの酢酸（非緩衝）を夫々用いてQ-セファロース高速流カラムを洗浄した後の高塩洗浄液中に溶出したエリトロポエチンイソ形を示す。また、Laiら、前出、の実施例2に記載の手順を修正し、DEAE-アガロースクロマトグラフィーに代えてQ-セファロースクロマトグラフィーを用いて得られたイソ形混合物を含む精製組換えエリトロポエチンをゲルの左端レーンに示す。

図4は、Q-セファロースのカラムに使用した細胞馴化培

地に、漸減pH及び漸増イオン強度の勾配を与えることによって得られたエリトロポエチンイソ形8～12の分離を示す。分画2から分画40までの偶数番号の分画のアリコート分析用等電点電気泳動に掛けた。また、Laiら、前出、の実施例2に記載の手順を修正し、DEAE-アガロースクロマトグラフィーに代えてQ-セファロースクロマトグラフィーを用いて得られたイソ形混合物を含む精製組換えエリトロポエチンをゲルの左端レーンに示す。

図5は、ヒトエリトロポエチンのアミノ酸配列を示す。

□はN-結合炭水化物鎖が結合したアスパラギン残基を示し、

\*は、O-結合炭水化物鎖で修飾されたセリン残基を示す。

図6A、6B及び6Cは、ヒトエリトロポエチン類似体の構築及び分析用のプラスミドの作製に使用された一連のクローニング段階を示す。これらの類似体は図5に示すような付加的グリコシレーション部位を与えるアミノ酸変異を有している。

図7は、ヒト配列エリトロポエチン及び図示のエリトロポエチン類似体のCOS細胞上清のウェスタンブロット分析を示す。類似体 [Asn<sup>9</sup>, Ser<sup>11</sup>] EPO、[Asn<sup>6</sup>



<sup>9</sup>] EPO、[Asn<sup>125</sup>, Ser<sup>127</sup>] EPO及び[Pro<sup>124</sup>, Thr<sup>125</sup>] EPOを実施例 6 に記載の手

順で構築する。比較のために、付加的炭水化物鎖を含まない追加の類似体 [Pro<sup>125</sup>, Thr<sup>127</sup>] EPO及び[Asn<sup>126</sup>, Ser<sup>128</sup>] EPOを示している。

図 8 は、N-グリカナーゼ処理後のヒト配列エリトロポエチン及び図示のエリトロポエチン類似体のCOS細胞上清のウェスタンブロット分析を示す。類似体 [Thr<sup>125</sup>] EPO及び[Pro<sup>124</sup>, Thr<sup>125</sup>] EPOを実施例 6 に記載の手順で構築した。比較のために、類似体 [Val<sup>126</sup>] EPO、[Pro<sup>124</sup>] EPO、[Pro<sup>125</sup>] EPO、[Thr<sup>127</sup>] EPO、[Pro<sup>125</sup>, Ser<sup>127</sup>] EPO及び[Thr<sup>125</sup>, Ser<sup>127</sup>] EPOを示している。

図 9 は、[Thr<sup>125</sup>] 突然変異を含むエリトロポエチンcDNAでトランスフェクトしたCHO細胞の増殖を支持した細胞培地のQ-セファロース及びC4逆相クロマトグラフィーによって得られたプール 2、3 及び 4 の等電点電気泳動ゲルを示す。更に、Laiら、前出、の実施例 2 に記載の手順を修正し、DEAE-アガロースクロマトグラフィーに代えてQ-セファロースクロマトグラフィーを用いて得られたイソ形の混合物を含む精製組換えエリトロポエチンをゲルの左端及び右端のレーンに示す。

図10は、組換えヒトエリトロポエチン (rHuEPO) 及び選択

された類似体のCOS細胞上清のウェスタンブロット分析を示す。類似体の構築は実施例 6 に記載されている。類似体N9、N14、N18、N19、N21、N24及びN39は、ゲル移動度の遅延によって証明されるように少なくとも 1 つの付加的炭水化物鎖を有する。

図11は、N-グリカナーゼ消化中の組換えヒトエリトロポエチン及びEPO N14類似体のCOS細胞上清のウェスタンブロット分析を示す。0、4、12及び45分消化後及び一夜消化後を測定時点とした。

図12は、EPO N14類似体イソ形調製物の等電点電気泳動ゲルを示す。等電点の低いイソ形プールは 1 分子あたり概して6~12個のシアル酸を有するEPO N14類似体を含み、中間のイソ形プールは 1 分子あたり概して10~15個のシアル酸を有す

る類似体N14を含み、高いイソ形プールは1分子あたり概して12~17個のシアル酸を有するEPO N14類似体を含んでいる。

図13は、ラットに静注後の組換えヒトエритроポエチン、単離イソ形14及びEPO N14類似体（イソ形15-17）の薬物動態を示す。

図14は、種々の量の非標識rHuEPO、単離イソ形14または

EPO N14類似体の存在下でエритроポエチン受容体に結合する<sup>125</sup>I標識組換えヒトエритроポエチンの低温置換アッセイを示す。

図15は、EPO N14の高イソ形プール（0.036及び0.0712  $\mu$ g）、単離イソ形14（0.036及び0.0712  $\mu$ g）、EPO 177の低イソ形プール（0.0712  $\mu$ g）及びrHuEPO（0.071  $\mu$ g）の活性を比較するマウスヘマトクリット試験を示す。

#### 発明の詳細な説明

本発明はエритроポエチンのイソ形を提供する。本発明によって得られる特定のエритроポエチンイソ形及びそれらの特性は、出発物質のソース次第で様々に異なるであろう。例えば、尿由来ヒトエритроポエチンイソ形は、組換えエритроポエチンイソ形と比べて異なる。好ましい実施態様において、本発明は、エритроポエチン1分子あたり1~14から成るグループから選択された特定数（即ち0より大きい所定数）のシアル酸を有するエритроポエチンイソ形に関する。好ましい数は9、10、11、12、13または14である。別の実施態様においては、この数は14よりも大きく、好ましくは16~23である。

本明細書中で使用される「エритроポエチンイソ形」なる

用語は、単一等電点（pI）を有し且つ同じアミノ酸配列を有するエритроポエチン調製物を意味する。本明細書中で使用される「エритроポエチン」なる用語は、天然エритроポエチン、尿由来ヒトエритроポエチン、及び、天然エритроポエチンに十分に類似したアミノ酸配列及びグリコシレーションを有しており骨髓細胞による網状赤血球及び赤血球細胞の産生を増進するin vivo生物特性を有している非天然ポリペプチドを意味する。

尿由来ヒトエритроポエチンのアミノ酸配列を有する組換えエритроポエチン

の個別のイソ形は1~14個のシアル酸を有するエリトロポエチン分子に対応していること、及び、精製された組換えエリトロポエチン中に存在するイソ形の各々は該イソ形が有しているシアル酸の数に関連したin vivo活性を有していることが知見された。

好ましい実施態様において、エリトロポエチンは、ヒト以外の真核宿主細胞にトランスフェクトされた外因性DNA配列の発現産物である。即ち、好ましい実施態様において、エリトロポエチンは、「組換えエリトロポエチン」である。組換えエリトロポエチンは、参照によって本明細書に含まれるLin名義の米国特許第4,703,008号に記載の手順に従っ

て有利に産生される。組換えエリトロポエチンは、参照によって本明細書に含まれるLaiら名義の米国特許第4,667,016号の実施例2に記載の汎用手順に従って精製されるか、または、Laiらの実施例2に記載の手順を修正しDEAE-アガロースクロマトグラフィーに代えてQ-セファロースクロマトグラフィーを用いる処理によって精製され得る。

Laiら、前出、の実施例2に従って精製されたエリトロポエチンは、IEFによって分析すると主として6つのイソ形を含んでいる。更に、実施例4に記載のクロマトグラフィー手順を用いて、より高い酸性度を有する少なくとも1つの追加のイソ形が検出された。（IEFゲル上で>14シアル酸に泳動するより高度に酸性のこのイソ形は、ある種の電荷がシアリダーゼ消化に対して耐性を示すので非シアル酸負電荷を含んでいるであろう）。これらのイソ形の相互間の違いはシアル酸含量の違いに基づく。このことは、実施例に示すように、10個のイソ形を分取用IEFによって単離し、そのうちの5つのイソ形のシアル酸含量を測定することによって証明される。シアル酸含量を検定したイソ形のうちの5つのイソ形が9、10、11、12または13個のシアル酸残基を含むことが知見された。

エリトロポエチンの相対的in vivo比活性とイソ形5~11のエリトロポエチン1分子あたりのシアル酸残基の数との間には関係がある（本明細書では各イソ形をエリトロポエチン分子あたりのシアル酸の数に基づいて命名する）。イソ形11~14

は、ほぼ等しい相対的in vivo比活性を有している。イソ形5~14のin vivo活性を、低酸素症でない (exhypoxic) 赤血球増加症マウスのバイオアッセイによって検定し、各イソ形の存在量をBradfordタンパク質アッセイ、280nmの吸光度またはエリトロポエチン用ラジオイムノアッセイ (RIA) によって測定する。単位/mlで示されるRIAの測定値 (Egrieら、Immunobiology 172, 213 (1986)) を、RIAによって測定された精製エリトロポエチンの平均比活性即ち212,770単位/mgエリトロポエチンポリペプチドによって除算すると、単離イソ形またはイソ形混合物のタンパク質濃度が、1 mlあたりのエリトロポエチンポリペプチドのmgとして得られる。実施例に示すように、相対的in vivo比活性は、イソ形5からイソ形11まで段階的に増加する (表2)。

本明細書中のin vivo比活性なる用語は、相対的in vivo比活性の測定値を意味しており、絶対的in vivo比活性の測定値を意味しない。本願では、同じアッセイを使用し、

同じ内部標準も含めた同じ条件及び同じ種類の動物を使用し、比活性の計算に同じデータ分析を使用し、同じタンパク質含量測定アッセイを使用して検定されたイソ形の相対的活性を比較するためにのみ比活性を使用する。任意のイソ形について報告されたin vivo比活性は該イソ形の固有値即ち絶対的な値を示すものではない。

本発明はまた、2種以上のエリトロポエチンイソ形から成る組成物を提供する。1つの実施態様では、組成物が、エリトロポエチン1分子あたり所定数よりも多いシアル酸、例えばエリトロポエチン1分子あたり11よりも多いシアル酸、または1分子あたり12よりも多いシアル酸を有するイソ形の混合物、例えばイソ形12、13及び14の混合物から成る。別の実施態様では、組成物が、エリトロポエチン1分子あたり所定数、例えば1分子あたり9以上12未満のシアル酸を有するイソ形の混合物、例えばイソ形9、10及び11の混合物から成る。本発明はまた、イソ形を同じ相対量または異なる相対量で含むエリトロポエチンイソ形の組成物を提供する。例えば、イソ形9、10及び11の混合物には、これらのイソ形が1:1:1、2:3:1または20:20:1のような種々の割合で存在し得る。

好ましくは、組成物が、4種未満のイソ形の混合物、例えばイソ形11、12及び13の混合物、または12と14との混合物、または7と13との混合物から成る。

本発明はまた、エリトロポエチンイソ形の混合物を産生するために、選択されたエリトロポエチンイソ形を同時に単離する方法を提供する。これらの方法は、分取用等電点電気泳動のような技術による個々のイソ形の単離、またはイオン交換クロマトグラフィーもしくは等電点クロマトグラフィーのような技術による1分子あたり所定数（例えば11よりも多い数）のシアル酸を有するイソ形の混合物の調製を含む。これらの技術はすべて、電荷によるタンパク質の分離に基づく技術である。

概して、イオン交換クロマトグラフィー及び等電点クロマトグラフィーでは、粗ヒトエリトロポエチン（細胞馴化培地）または精製物質を、エリトロポエチンイソ形の一部または全部が樹脂に結合し得る条件下で使用する。粗エリトロポエチン調製物の場合は、pH約7のカラムにタンパク質を添加するのが好ましく、精製調製物の場合はpH7以下約pH4までのカラムにタンパク質を添加し得る。pH約4の緩衝液でカラムを洗浄後、緩衝液のpH及び塩濃度を増加させ

るかまたは漸減pH及びpH約4の漸増イオン強度の勾配を使用することによって、イオン交換カラムに結合したエリトロポエチンイソ形を溶出させる。等電点クロマトグラフィーの場合は、漸減pHの勾配を用いるかまたはカラムを高濃度の塩で洗浄することによってカラムからイソ形を溶出させる。

好ましい実施態様では、イオン交換クロマトグラフィーを用いて個々のイソ形を単離する。一例として、実施例8に記載のようなイオン交換クロマトグラフィーを用いてイソ形14を単離した。

また、ヒトエリトロポエチンのいくつかの類似体も本発明に包含される。本明細書中で使用される「ヒトエリトロポエチン類似体」なる表現は、ヒトエリトロポエチンのアミノ酸配列中に1つまたはそれ以上の変異を有しその結果としてシアル酸結合部位の数が増加したエリトロポエチンを意味する。類似体は、グリコシレーション可能な部位を増加させるかまたは変異させるアミノ酸残基の付加、欠失または置換を有する部位特異的突然変異誘発によって作製される。このよう

な類似体は、ヒトエリトロポエチンよりも多数の炭水化物鎖を有し得る。

本発明のエリトロポエチン類似体は、少なくとも1つの付加的グリコシレーション部位を含むアミノ酸配列から成る。ヒトエリトロポエチン中で観察されるレベルを上回るシアル酸レベルを有する類似体は、生物活性に必要な二次または三次コンホメーションを妨害しないグリコシレーション部位を付加することによって作製される。好ましくは、ヒトエリトロポエチン類似体は、1、2または3個の付加的なN-グリコシレーション部位またはO-グリコシレーション部位を有しており、1、2または3個の付加的なN-結合またはO-結合炭水化物鎖が付加される。例えば、69位のロイシンをアスパラギンで置換すると、配列Asn-Leu-Serが形成され、これは第4のN-グリコシレーション部位として作用する。このような変異は通常は1分子あたり4個以下の付加的シアル酸を提供し得る。付加的O-グリコシレーション部位を生じさせる変異の例は、125位のアラニンからトレオニン、124位及び125位の夫々のアラニンからプロリン及びトレオニンへの変異である。1つまたはそれ以上の付加的N-結合及びO-結合鎖を有する類似体、例えば表5に記載の類似体N01及びN02を構築してもよい。当業者には明らかであろうが、本発明は付加的グリコシレーション部位を有

するヒトエリトロポエチンの他の多くの類似体を包含する。

グリコシレーション部位に増加した炭水化物結合レベルを有する類似体も本発明に包含される。このような類似体は通常、N-結合またはO-結合部位の極めて近傍に1つまたはそれ以上のアミノ酸置換を含む。これらのアミノ酸変異の結果として、炭水化物修飾を有するエリトロポエチンポリペプチドの割合が増加しているであろう。グリコシレーション部位は天然産生でもよくまたは突然変異によって生じてよい。例えば、類似体N13は、88位にグリコシレーション部位が導入されても付加的炭水化物鎖を生じない。しかしながら、87位に置換セリン残基及び置換バリリン残基を夫々有する類似体N14及びN18は、88位に付加的炭水化物鎖を有している。

本発明はまた、エリトロポエチンのカルボキシ末端から延長する1つまたはそ

れ以上のアミノ酸を有しカルボキシ末端延長部が少なくとも1つの付加的炭水化物部位を与える類似体を提供する。1つの実施態様では、ヒト絨毛性ゴナドトロピン (HCG) のカルボキシ末端の28個のアミノ酸をヒトエリトロポエチンの166位のアルギニン残基に融合さ

せることによって類似体を構築した。HCG-カルボキシ末端フラグメントは4つのO-グリコシレーション部位を有している (Kesslerら、J. Biol. Chem. 254, 7907 (1979) )。

表3、4及び5は、付加的なN-結合及び/またはO-結合炭水化物鎖部位を有するエリトロポエチン類似体の一覧である。類似体は、N-結合部位を生じるようにヒトエリトロポエチンポリペプチド鎖中の種々の位置で置換されたAsn-X-Ser/Thr配列を有しているかまたはO-結合部位を生じるように導入されたセリンもしくはトレオニン残基を有している。

表6は、SDSゲル上の糖タンパク質の泳動によって証明されるように (実施例7)、少なくとも1つの付加的なN-結合もしくは1つの付加的なO-結合炭水化物鎖が付加されているか、または付加的なN-結合及びO-結合鎖が同時に付加されている類似体の一覧である。表3～6から明らかなように、1つ以上の付加的な炭水化物結合部位を有する類似体が必ずしも付加的な炭水化物鎖を有するエリトロポエチン分子になるとは限らない。例えば、123位及び125位のトレオニン残基の置換の結果としてはO-結合炭水化物鎖が付加されるが、その他の位置のセリンまたはトレオニンの置

換は付加的なO-結合鎖を有する類似体を生じない (表4参照)。しかしながら、ヒトエリトロポエチンアミノ酸配列中の30、51、57、69、88、89、136及び138位のアスパラギン残基の置換の結果としては、これらの部位にN-結合鎖が付加される。HCGポリペプチドフラグメントをヒトエリトロポエチンの166位のアルギニン残基に融合させると、少なくとも2つの付加的O-結合炭水化物鎖を有するエリトロポエチン-HCG融合分子が得られる。

本発明のエリトロポエチン類似体はまた、少なくとも1つのグリコシレーショ

ン部位の転位を含むアミノ酸配列を有するエリトロポエチンを包含する。本明細書中で使用されるグリコシレーション部位の転位 (rearrangement) という表現は、ヒトエリトロポエチン中の1つまたはそれ以上のグリコシレーション部位の欠失及び1つまたはそれ以上の非天然グリコシレーション部位の付加を意味する。類似体R1、R2及びR3は、かかる転位の例であり、夫々24、38または83位のN-結合部位の欠失及び88位のN-結合部位の付加によって構築された。しかしながら、その他の多数種の炭水化物部位の転位が可能であり、得られる類似体は、ヒトエリトロポエチンに比べて増加した数のグリコシレーション

ン部位を有していてもよく有していなくてもよい。

類似体R1、R2及びR3の *in vivo* 生物活性を分析し、結果を表7に示す。Asn88にN-結合鎖を導入すると、生物活性は、3つの天然産生N-結合部位のいずれかが欠失したエリトロポエチンまで回復した。これらの結果は、生物活性に有意な影響を与えることなく有用な類似体を作製するために、エリトロポエチン中の炭水化物鎖の位置を変更してもよいことを示す。

また、付加的なN-結合及び/またはO-結合鎖部位を有するエリトロポエチン類似体、少なくとも1つの炭水化物鎖結合部位の転位を有する類似体、エリトロポエチンのカルボキシ末端から延長する1つまたはそれ以上のアミノ酸を有する類似体をコードするDNA配列も本発明に包含される。炭水化物結合部位を生成させ変異させる目的でヒトエリトロポエチンDNA配列中に変異を導入する手順は実施例6に開示されている。

これらのエリトロポエチン類似体は、組換えDNA技術によって産生された外因性DNA配列の発現産物でもよく、または合成産物でもよい。外因性DNA配列としては、エリトロポエチン類似体をコードするcDNA、ゲノムDNAまたは化

学合成DNAがある。これらの類似体の発現に有用な組換えDNAプラスミド及び真核性宿主細胞も提供される。発現ベクターとしては、クローニングされたDNA配列を真核性宿主細胞中で発現させ得る任意のベクター、特にCOS及びCHO細胞中で発現させるために使用されるベクターがある。かかるベクターの例としては、本明



細書の実施例6に記載のプラスミドpEC及びpDECΔがある。エリトロポエチン類似体を発現するCOS及びCHO宿主細胞の培養は当業者に公知の手順を用いて行った。

エリトロポエチン類似体に由来の単離イソ形及びイソ形混合物は、上述のヒトエリトロポエチンイソ形の調製方法を用いて得られる。これらの方法としては、等電点電気泳動、イオン交換クロマトグラフィー及び等電点クロマトグラフィーがある。エリトロポエチン類似体に由来の個々のイソ形またはイソ形混合物を調製するためにはイオン交換クロマトグラフィーを使用するのが好ましい。

エリトロポエチンの炭水化物鎖の数、従ってエリトロポエチン1分子あたりのシアル酸の数が増加すると、溶解度の増加、タンパク質分解に対する耐性の強化、免疫原性の低下、血清半減期の延長及び生物活性の増加などの有利な

特性が与えられるであろう。

エリトロポエチン類似体を発現するCHO細胞からの馴化培地でin vivo生物活性を分析し、結果を表6に示す。試験したいくつかの類似体はヒトエリトロポエチンの3倍以上の活性を有していた。特に、30位または88位に付加的なN-結合炭水化物鎖を有する類似体はヒトエリトロポエチンの2～3倍高い活性を示し、ヒトエリトロポエチンをHCGポリペプチドフラグメントに融合した結果得られた付加的なO-結合部位を有する類似体は2倍以上の活性を有している。

付加的な炭水化物鎖を有する2つのエリトロポエチン類似体を精製し、異なるシアル酸含量を有するイソ形の混合物を単離した（実施例8）。Thr<sup>125</sup>及びSer<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>（EPO N14）類似体を個別の3つのイソ形分画に分離し、各分画毎のin vivo生物活性を測定した。表8に与えた結果は、より高いシアル酸含量を有するEPO N14イソ形分画がより大きいin vivo活性を有することを示す。

EPO N14類似体及び組換えヒトエリトロポエチンの高シアル酸イソ形（イソ形9～14）のプールを、受容体結合アッセイ、薬物動態実験及びマウスのヘマトクリット増加測定実験で試験した。これらのアッセイの結果は、シアル酸含

量、クリアランス半減期及び処理マウスのヘマトクリット増加能力の間に直接的

関係があることを示す。従って、図13、図14及び図15に示すように、EPO N14の高シアル酸イソ形プールは、単離イソ形14または組換えヒトエритроポエチンに比較して、同様に強力な受容体結合を示すことはなかったが、in vivo半減期の有意な延長及びヘマトクリット増加の促進を示した。

本発明の別の実施態様は、ヒトエритроポエチンイソ形、または1分子あたり特定数よりも多いシアル酸、例えば1分子あたり10よりも多いシアル酸を有するエритроポエチン類似体を優先的に合成する哺乳類（例えばチャイニーズハムスター卵巣、CHO）宿主細胞に関する。エритроポエチン分子は、分子のシアル酸含量を限定し得るN-結合またはO-結合オリゴ糖構造を有している。例えば、4つの受容部をもつ（4枝の）N-結合オリゴ糖は概して4つのシアル酸結合可能部位を与えるが、4枝形のアスパラギン結合部位に置換し得る2枝または3枝のオリゴ糖鎖は通常は2個または3個以下のシアル酸と結合できるだけである。O-結合オリゴ糖は通常、2つのシアル酸結合部位を与える。従って、エритроポエチン分子は、3つのN-結合部位全部が4枝であるな

らば合計14個のシアル酸残基を受容し得る。組換えエритроポエチンに4枝の鎖を優先的に付加しこれによって最大数のシアル酸結合部位を提供し得る細胞を哺乳類細胞培養物からスクリーニングする。

尿エритроポエチンのN-結合オリゴ糖は、ガラクトースに対して $\alpha 2, 3$ 及び $\alpha 2, 6$ の双方の結合でシアル酸を含有している（Takeuchiら、J. Biol. Chem. 263, 3657 (1988)）。典型的には、 $\alpha 2, 3$ 結合のシアル酸はマンノース $\alpha 1, 6$ ブランチ上のガラクトースに付加され、 $\alpha 2, 6$ 結合のシアル酸はマンノース $\alpha 1, 3$ ブランチ上のガラクトースに付加される。これらのシアル酸を付加する酵素（ $\beta$ -ガラクトシド $\alpha 2, 3$ シアリルトランスフェラーゼ及び $\beta$ -ガラクトシド $\alpha 2, 6$ シアリルトランスフェラーゼ）は夫々、マンノース $\alpha 1, 6$ ブランチ及びマンノース $\alpha 1, 3$ ブランチにシアル酸を極めて効率的に付加する。

ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）欠失チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞は、組換えエритроポエチンのような組換え糖タンパク質産生のための常用の宿主細胞である。これらの細胞は酵素 $\beta$ -ガラクトシド $\alpha 2, 6$ シアリルトラン

スフェラーゼを発現せず、従ってこれらの細胞中で産生され

た糖タンパク質のN-結合オリゴ糖に $\alpha$ 2,6結合でシアル酸を付加しない。(Mutsaersら、Eur. J. Biochem. 156, 651, (1986) ; Takeuchiら、J. Chromatogr. 400, 207 (1987) )。その結果、CHO細胞中で産生された組換えエリトロポエチンは、ガラクトースに対し2,6結合するシアル酸を欠失している (Sasakiら、(1987)、前出 ; Takeuchiら、(1987)、前出)。

本発明の別の実施態様においては、ヒトエリトロポエチンまたはエリトロポエチン類似体が、ガラクトースに対し $\alpha$ 2,6結合でシアル酸を取り込むために機能性 $\beta$ -ガラクトシド $\alpha$ 2,6シリアルトランスフェラーゼ遺伝子でトランスフェクトされたCHO細胞中で産生される。得られたイソ形は、ガラクトースへの $\alpha$ 2,3及び $\alpha$ 2,6結合の双方を有するシアル酸を含有するであろう。修飾CHO細胞またはその他の哺乳類宿主細胞を作製する技術の記載に関しては、Leeら、J. Biol. Chem. 264, 13848 (1989) を参照されたい。該文献の記載内容は本明細書に含まれるものとする。

治療有効量の特定のイソ形またはイソ形混合物を、エリトロポエチン治療に有用な適当な希釈剤、アジュバント及び/または担体と共に含む医薬組成物も本発明の範囲に包

含される。治療有効量のエリトロポエチン類似体を適当な希釈剤、アジュバント及び/または担体とともに含む医薬組成物も本発明の範囲に包含される。本明細書中で使用される「治療有効量」なる用語は、所与の症状及び投与養生法に対して治療効果を与える量を意味する。ヒトエリトロポエチンのイソ形またはエリトロポエチン類似体の投与は非経口経路によるのが好ましい。選択される特定経路は治療される病状次第である。ヒトエリトロポエチンのイソ形またはエリトロポエチン類似体は好ましくは、ヒト血清アルブミンのような適当な担体、緩衝生理食塩水溶液のような適当な希釈剤及び/または適当なアジュバントを含む製剤の一部として投与される。必要な投与量は、患者のヘマトクリットを増加させるために十分な量であり、治療される病状の重症度、使用される投与方法などに従って

加減できる。

以下の実施例は、本発明をより十分に説明するために与えられたものであるが、本発明の範囲をを限定すると理解されてはならない。実施例で使用したin vivoバイオアッセイに使用したエリトロポエチン標準は、部分精製した尿エリトロポエチン標準に対して標準化したものである。従って、相対的なin vivo比活性だけを測定している。また、

使用したエリトロポエチン標準を既存のいかなる国際標準にも直接関連させなかったため、in vivo比活性を、「IU/ml」、「IU/mg」及び「IU/A<sub>280</sub>」でなく「単位/ml」、「単位/mg」及び「単位/A<sub>280</sub>」で示している。

#### 実施例1：組換えエリトロポエチンイソ形の単離

Linら、前出、の記載に従って組換えエリトロポエチンを産生する。第1及び第3のイソ形単離用の出発物質として使用される組換えエリトロポエチンを、Laiら名義の特許、前出、の実施例2に記載の手順で精製する。第2及び第5のイソ形単離用の出発物質を、Q-セファロースを用いるように修正したLaiら、前出、に記載の方法に従って精製する。これらの調製物は、尿由来ヒトエリトロポエチンと同じアミノ酸配列を有する組換えエリトロポエチンのイソ形混合物を含有し、主としてイソ形9～14を含有している。第4のイソ形調製用の出発物質は、Laiらの実施例2のアニオン交換カラムの5 mMの酢酸/1 mMのグリシン/6Mの尿素洗浄の間に溶出する物質である。この分画は、9個以下のシアル酸を有するイソ形を含有しており、分取用等電点電気泳動手順に使用する前にLaiらの実施例2に記載されたようなゲル濾過クロマトグラフィーによって更に精製した。第6の

イソ形調製用の出発物質としては4～13個のシアル酸残基を有する組換えエリトロポエチンの精製調製物を使用した。この物質は、出発物質中に存在するイソ形をほぼ保持するイオン交換カラムを用いるように修正した（pH8.4の塩化ナトリウム勾配によって組換えエリトロポエチンを溶出させ酢酸/尿素洗浄液を削除する）Laiらの実施例2の手順で精製した。

本質的にLKB Application Note 198に記載の顆粒状ゲルベッド（Ultrodex, LK

B) を用いた分取用等電点電気泳動によって異なる 6 つの個別イソ形を調製した。Pharmalyte (Pharmacia) 2.5-5アンホライト (Pharmacia) を使用し、ゲルベッドは5Mの尿素を含有している。

第1の調製では、6.8mlの20mMのクエン酸ナトリウム/100mMの塩化ナトリウム、pH7.0中の約20mgの組換えエリトロポエチンをゲルに添加し、8ワットで約16時間フォーカシングする。等電点電気泳動後、ゲルベッドの紙接触プリントによってゲル内のイソ形バンドを可視化する。プリントを作成し、次いで定着溶液 (40%メタノール/10%酢酸/10%TCA/3.5%スルホサリチル酸) を3回交換して浸漬 (各回約10分間、室温) させることによって定着し、40%メタノール/10%酢酸 (30~60℃) で1回 (約10分間) 処理し、0.125%クーマシーブルー-R-250/40%メタノール/10%酢酸中で60℃で15分間染色し、次いで7.5%メタノール/10%酢酸中で脱色して、分離されたイソ形を可視化する。イソ形を含有する顆粒状ゲルベッドの領域 (樹脂の~50%) を取り出し、水 (~16ml) を添加し、スラリーを5.5×24.5インチのトレーに注ぎ、正味重量~40gまで蒸発させる。この調製物を2回目にフォーカシングし、前回と同様にゲルベッドの接触プリントを作成する。識別可能な6つのイソ形の各々を含むゲル部分をゲルベッドから取り出す。

ゲルからイソ形を溶出させるために、10mMのTris-HCl, pH7.0/5mMのChapsを含有する溶液を各イソ形に添加してスラリーを調製する。スラリーを小カラムに入れ、Tris-Chaps緩衝液で洗浄する。素通り分 (flow through) を収集し、20%エタノール/10mMのTris-HCl, pH7.0中で平衡させたVydac C4逆相樹脂を収容した小カラム (オープンカラム構造) に別々に導入する。20%エタノール/10mMのTris-HCl, pH7.0、35%エタノール/10mMのTris-HCl, pH7.0及び65%エタノール/10mMのTris-HCl, pH7.0によってカラムを段階的に展開させる。65%エタノール/10mMのTrisに溶出する分画を、

10mMのTris-HCl, pH7.0によって1:1に希釈し、濃縮し、次いでCentricon-10 (Amicon) 微量濃縮装置 (microconcentrator) を用いて、緩衝液を10mMのTris-HCl

、pH7.0と交換する。5Mの尿素を含むポリアクリルアミドゲル中で、Servalyte3-5アンホライン (Serva) を用い、本質的にLKBテクニカルノート250に記載された手順で、この調製物を分析用等電点電気泳動にかける。

第2の調製では、6.5mlの脱イオン水中の約26mgの組換えエリトロポエチンをゲルに添加し、2.5ワットで35分間及び10ワットで約17時間フォーカシング処理する。ゲルベッドで観察された泳動タンパク質バンドを11個の異なるプールとして取り出す。各プールを脱イオン水で約7.5mlにし、得られた各プールの20mlの上清を上述のような分析用等電点電気泳動にかける。各プールに5mlの1.5MのTris-HCl, pH8.8を添加し、スラリーの各々を小カラムに導入し、液相を流通させる。樹脂を約3倍容の0.5MのTris-HCl, pH7で洗浄し、洗浄液を素通り分と合わせる。カットオフ分子量10,000ダルトンのAmicon使い捨て限外濾過デバイスを用いて、溶出液を濃縮し、緩衝液を20mMのクエン酸ナトリウム/100mMの塩化ナトリウム, pH7.0と交換する。濃縮した溶液 (約0.5ml) を次に、カットオフサイズ0.22ミクロンの酢酸セルロースフィルターに通す。分析用等電点電気泳動に基づいて、5つのプールが単一イソ形10、11、12、13及び14を主として含むことが知見される。

第3の調製では、21.8mlの蒸留水中の約30mgの組換えエリトロポエチンをゲルに添加し、2ワットで25分間、10ワットで20時間及び15ワットで15分間フォーカシング処理する。個々のイソ形に対応するタンパク質バンドを肉眼で観察しゲルベッドから取り出す。ゲル単離したイソ形に蒸留水を添加してスラリーを調製し、得られた上清を分析用等電点電気泳動によって分析する。等量の1MのTris-HCl, pH7.2を各スラリーに添加し、懸濁液を個別の小カラムに入れ、液相をカラムに通過させてイソ形を溶出させる。カットオフ分子量10,000ダルトンのAmicon使い捨て限外濾過デバイスを用いて、各素通り分を濃縮し、緩衝液を20mMのクエン酸ナトリウム/100mMの塩化ナトリウム, pH7.0と交換する。分析用等電点電気泳動ゲルは、単一イソ形9、10、11、12、13及び14を主として含むプールが得られることを示した。

第4のイソ形調製では、イソ形3～9を含むエリトロポエチン (上述の手順で

調製)を出発物質として使用した。調製

物1～3に関する上記の記載とほぼ同様に行う分取用等電点電気泳動に先立って、等電点の低い出発物質により適したアンホライト範囲を与えるために、アンホライト (Pharmalyte 2.5-5) をRotofor (Bio-Rad, Richmond, CA) 液相等電点電気泳動槽中で予め分画した。予分画は、6.7mlのPharmalyte 2.5-5を15gの尿素と混合し、容量50mlまで純水を添加することによって行った。この混合物をRotofor内で0.1Mのリン酸及び0.1Mの水酸化ナトリウムを夫々陽極液及び陰極液として用い10ワット、1℃で5時間半処理することによって分画した。pH測定値4.5～約6を有するアンホライト分画をフラットベッド等電点電気泳動に使用した。

Centrioluter (Amicon, Danvers, MA) 及びカットオフ分子量10,000のCentricon (Amicon) を用い、以下のパラメーター、即ち、0.18のTris緩衝液pH8.8、100ボルト、25～30mA、3時間を用いてイソ形からアンホライトを除去した。次に、Sephadex G-25 (Pharmacia) を用いたゲル濾過によってイソ形の緩衝液を0.1Mの塩化ナトリウムに交換した。得られた5つのプールの分析用等電点電気泳動は、これらのプールがイソ形4、5、6、7及び8を含むことを示した。イソ形4は複数のバンドとして溶出し、これはこのイソ形が

ある程度分解されたことを示す。

第5のイソ形調製は、フラットベッド等電点電気泳動手順にプレフォーカシング段階を加えることによって修正した。この修正では、タンパク質を電気泳動前にアンホライト/尿素/ゲル混合物に添加せず、ゲルベッド中でpH勾配を作成した後、等電点電気泳動装置に添加した。75分間(1500ボルト一時)のプレフォーカシング後、2.25～4.25cmのゲルベッド切片を陰極から取り出し、エリトロポエチン溶液と混合し、ゲルベッドに戻した。等電点電気泳動後、イソ形10、11、12、13及び14がゲルベッドから溶出し、Centricon-10 (Amicon) デバイスを用いた限外濾過によってこれらのイソ形をアンホライトから分離した。

プレフォーカシング段階は、イソ形調製物の紫外線吸光特性を出発組換えエリトロポエチンの特性にいつそう近いものにするために加えた修正である。スペク

トル特性のこのような改良は、単離イソ形の280nm及び260nmの吸光度の比として現れる。調製物2及び3（プレフォーカシング非使用）で得られたイソ形の場合には280nmの吸光度と260nmの吸光度との平均比（ $A_{280}/A_{260}$ ）が $1.36 \pm 0.11$ であるが、調製物5及び6（プレフォーカシング使用）の場合には $A_{280}/A_{260}$

比が $1.68 \pm 0.20$ である。イソ形#14を計算から除外すると、調製物2及び3並びに調製物5及び6の平均 $A_{280}/A_{260}$ 比は夫々、 $1.39 \pm 0.11$ 及び $1.74 \pm 0.09$ である。（イソ形14は、最小量で存在し従ってアンホライト成分の微量夾雑によって干渉され易い、またはフラットベッド等電点電気泳動手順中に電極に最も近い、などの理由で、最も変則的なスペクトルを有するであろう）。（アニオン交換樹脂としてQ-セファロースを用いるように修正した）Laiらの実施例2に従って調製した組換えエリトロポエチンの平均 $A_{280}/A_{260}$ 比は $1.91 \pm 0.04$ である。

上述のごとく、イソ形調製物#6の出発物質は、イソ形4～13を含む組換えエリトロポエチン調製物であった。アンホライトを第4の調製と同様にRotofor装置内でプレフォーカシングした。pH測定値3.7～4.8を有するアンホライト分画をフラットベッド等電点電気泳動に使用した。処理#5と同様にフラットベッドをプレフォーカシングし、アンホライト担体を除去するために限外濾過（Centricon-10）した後、イソ形9、10、11、12及び13が得られた。

#### 実施例2：組換えエリトロポエチンイソ形のシアル酸含量

実施例1に記載のごとく単離したイソ形及びLaiら、前出、に記載の手順で精製したエリトロポエチン（イソ形9～14の混合物）の緩衝液を0.10～0.15Mの塩化ナトリウムに交換し、Jourdainら、J. Biol. Chem. 246, 430 (1971)、の手順の修正手順によってシアル酸含量を分析する。0.35Mの硫酸で80℃で30分間加水分解することによって糖タンパク質からシアル酸残基を開裂し、分析前に水酸化ナトリウムで溶液を中和する。エリトロポエチンタンパク質の存在量を推定するために、Bio-Radによって供給されるアッセイ試薬及び微量法手順を用い、ヒトエリトロポエチンのアミノ酸配列を有する組換えエリトロポエチンを標準として用いてBradfordタンパク質アッセイ（Bradford Anal. Biochem. 72, 248 (1976



）を行う。その結果を、エリトロポエチン1モルあたりのシアル酸のモル数として表1に示す。1分子あたりのシアル酸の数に従って低酸性（イソ形9）から高酸性（イソ形14）の範囲までイソ形を命名する。イソ形9～13は図1のゲルレーン6～10に示されている。イソ形14はシアル酸含量を正確に測定するために十分な量で得られないため、このイソ形のシアル酸含量はIEFゲル上の泳動を他

のイソ形に比較することによって推定する。イソ形5～8（調製物#4）のシアル酸含量は測定しなかったがIEFゲル上の移動度から同様に推定する。

表 1

<u>エリトロポエチンイソ形</u>	<u>シアル酸/エリトロポエチン</u> <u>(モル/モル)</u>
イソ形13	12.9±0.5
イソ形12	11.8±0.2
イソ形11	11.0±0.2
イソ形10	9.8±0.3
イソ形9	8.9±0.6
イソ形混合物(9～14)	11.3±0.2

#### 実施例3：組換えエリトロポエチンイソ形の活性

実施例1に記載のごとく単離したイソ形について、組換えエリトロポエチンの存在量を測定するために、280nmの吸光度、Bradfordタンパク質アッセイ及びエリトロポエチン用RIAによって検定する。低酸素症でない赤血球増加症マウス（exhypoxic polycythemic mouse）のバイオアッセイ（Cotesら、Nature 191, 1065（1961））を用い、相対的in vivo生物活性を測定する。エリトロポエチン用ラジオイ

ムノアッセイを用いてエリトロポエチンタンパク質の存在量を定量する場合、大

量のシアル酸を含有するイソ形では免疫反応性の見かけの減少が生じ、そのためエリトロポエチン濃度が過小評価され従って大抵の陰性イソ形の相対的in vivo比活性が過大評価されるので、ある種のイソ形では他の定量法よりも高い相対的in vivo比活性の値が得られた。単位/mlで表されたマウスバイオアッセイの測定値を対応タンパク質濃度によって除算すると、エリトロポエチンポリペプチド1mgあたりの単位で表されるin vivo比活性が算出される。これらの比活性を表2に示す。

表2において、「n」は、比活性値の測定に用いた個別のイソ形調製物の数である。多くの場合、イソ形調製物の各々に複数のin vivoアッセイを実施した。同じin vivoデータを用いて3つのカラム全部の比活性を計算し、単位/mgエリトロポエチンポリペプチドを、280nmの吸光度、ラジオイムノアッセイカ価またはBradfordタンパク質アッセイ結果から決定した。イソ形9～14を含有する精製組換えエリトロポエチンをBradfordタンパク質アッセイの標準として使用した。Bradfordアッセイを行うときには足りなくなっていた調製物もいくつかあったので、Bradfordタンパク質

アッセイを用いた計算では「n」が少ないものもある。

Laiら、前出、に記載の手順に従って精製されイソ形9～14の混合物を含有するエリトロポエチンをRIA及びin vivoアッセイ用標準として使用する。

単位/mgエリトロポエチンポリペプチドで表された相対的比活性に、エリトロポエチンポリペプチド0.807mg/A<sub>280</sub> を乗算することによって、単位/A<sub>280</sub> に変換し得る。この変換係数は、エリトロポエチンの吸光係数(1.345mg/A<sub>280</sub>)に、エリトロポエチン糖タンパク質のタンパク質含量(約60重量%、Davisら、*Biochemistry* 26, 2633 (1987))を乗算して算出されたエリトロポエチンポリペプチドmg/A<sub>280</sub> である(即ち、エリトロポエチン1.345mg/A<sub>280</sub> ×ポリペプチド0.60mg/mgエリトロポエチン=ポリペプチド0.807mg/A<sub>280</sub>)。更に、単位/mgエリトロポエチンポリペプチドで表された比活性に、ポリペプチド0.60mg/mgエリトロポエチン糖タンパク質という係数を乗算すると、比活性を単位/mgエリトロポエチン糖タンパク質で表すことができる。

表 2

イソ形	U/mg ポリペプチド (Bradford タンパク質アッセイ)	n	U/mg ポリペプチド (A280)	n	U/mg ポリペプチド (RIA)	n
14	289,400 ± 3,100	2	205,800 ± 37,700	2	366,700 ± 55,900	2
13	307,600 ± 30,600	4	258,700 ± 59,500	5	337,200 ± 40,200	5
12	275,200 ± 55,600	4	258,400 ± 41,700	5	287,700 ± 42,600	5
11	282,700 ± 41,100	3	255,800 ± 67,300	4	251,400 ± 62,700	4
10	188,000 ± 1,900	1	170,300 ± 34,500	3	171,900 ± 31,600	3
9	-		96,600 ± 46,700	2	113,600 ± 39,600	2
8	65,200 ± 3,800	1	70,600 ± 4,100	1	61,000 ± 3,500	1
7	46,200 ± 5,800	1	50,300 ± 6,300	1	42,800 ± 5,400	1
5	16,600 ± 1,700	1	18,300 ± 1,900	1	15,500 ± 1,600	1

表2のデータは図2A、図2B及び図2Cのグラフにも示されている。これらのデータは、エリトロポエチンの相対的in vivo活性がイソ形#11まではシアル酸含量の関数として増加することを示す。イソ形11~14は本質的に同じ相対的in vivo生物活性を有している。(このことはイソ形14の濃度をBradfordアッセイを用い

て表すときに極めて明らかである。イン形14に関してはBradford値が最も正確であろう。何故なら、得られる結果が概して低レベルであるため $A_{280}$ による測定は難しく、またRIAではまさに上述のような陰性形態の反応性減少が最も明白に生じるからである)。シアル酸の含量が多いほどエリトロポエチンイン形の相対的 *in vivo* 比活性が大きい理由は恐らく、これらの形の血流中の半減期がより長いからであろう。イン形9及び13を放射性ヨウ素 ( $^{125}\text{I}$ ) で標識し、ラット中でのクリアランス率を測定した。血流中の半減期はイン形13のほうがイン形9よりもかなり長かった。

#### 実施例4：Q-セファロースクロマトグラフィーによる組換えエリトロポエチンイン形混合物の選択

Linら、前出、に記載の手順に従って組換えエリトロポエチンを産生した細胞馴化培地を濃縮し、10mMのTris, pH7.

2に対し透析濾過する。ウシ血清アルブミンを標準として用いるBradfordマイクロタンパク質アッセイによってタンパク質濃度を測定する。40mgの総タンパク質を含有する19.6mlの溶液を $\text{CuSO}_4$ 中で $20\mu\text{M}$ にし、カットオフサイズ0.45ミクロンのフィルターで濾過し、 $4^\circ\text{C}$ の10mMのTris, pH6.8~7.0で平衡化しておいたQ-セファロースFast Flow (Pharmacia) を充填したベッドボリューム4ml (高さ1.05cm×直径2.2cm) のカラムに充填する。試料を添加した後、カラム容量の2倍の同じ緩衝液でカラムを洗浄する。カラムの流速は約1ml/分である。所定のエリトロポエチンイン形混合物を選択するためにこの手順を用いる個別の6個のカラムを準備する。

カラム容量の6~9倍の低pH緩衝液でカラムを洗浄する。緩衝液は、カラム#1では、NaOHでpH4.7に調整した150mMの酢酸、1mMのグリシン、20pMの $\text{CuSO}_4$ 、6Mの尿素から成り、カラム#2では、NaOHでpH4.7に調整した200mMの酢酸、1mMのグリシン、 $20\mu\text{M}$ の $\text{CuSO}_4$ 、6Mの尿素から成り、カラム#3では、NaOHでpH4.7に調整した250mMの酢酸、1mMのグリシン、 $20\mu\text{M}$ の $\text{CuSO}_4$ 、6Mの尿素から成り、カラム#4では、NaOHでpH4.7に調整した300mMの酢酸、1mMのグリシン、 $20\mu\text{M}$ の

CuSO<sub>4</sub>、6Mの尿素から成り、カラム#5では、150mMの酢酸、1mMのグリシン、20μMのCuSO<sub>4</sub>、6Mの尿素から成り、カラム#6では、300mMの酢酸、1mMのグリシン、20μMのCuSO<sub>4</sub>、6Mの尿素から成る。カラム容量の8~11倍の10mMのTris-HCl、55mMのNaCl、20μMのCuSO<sub>4</sub>、pH7によって各カラムを洗浄することによってカラムのpHを約7に上げる。10mMのTris-HCl、140mMのNaCl、20μMのCuSO<sub>4</sub>、pH7.0で洗浄することによって、所定のエリトロポエチンイソ形混合物をカラムから溶出させる。

各カラムから溶出したイソ形プールの濃縮し、AmiconCentricon-10微量濃縮装置を用いて溶媒を水に交換する。これらの濃縮プールの分析用等電点電気泳動の結果を図3に示す。ゲルレーン1~6は、カラム1~6から夫々溶出した所定のエリトロポエチンイソ形混合物を示す。図3の右端のゲルレーンに示す「イソ形混合物」は、上述のようなQ-セファロースカラムに添加される細胞培地を示す。5mMの酢酸、1mMのグリシン、20μMのCuSO<sub>4</sub>、6Mの尿素でカラムを洗浄し、上述の手順を用いてエリトロポエチンイソ形混合物をカラムから溶出させる。溶出したこのイソ形混合物を分析用等電点電気泳動に掛ける前にLaiら、前出、に記載の

手順に従って更に精製する。

#### 実施例5：Q-セファロース上の低pH勾配を用いる組換えエリトロポエチンイソ形の分画

別の手順では、pH漸減及びイオン強度漸増の勾配を用いてエリトロポエチンイソ形を分離する。濃縮し透析濾過したエリトロポエチン含有培地を、ゲル1mlあたり総タンパク質約40mgの割合でQ-セファロースカラムに充填する。次に、カラム容量の約2倍の10mMのTris-HCl、pH7.0でカラムを洗浄し、次いでカラム容量の約10倍の2mMの酢酸/1mMのグリシン/20μMのCuSO<sub>4</sub>/6Mの尿素（pH約4.8）で洗浄して、夾雑タンパク質及び約7個未満のシアル酸残基を含むエリトロポエチンイソ形を除去する。6Mの尿素/1mMのグリシン/20μMのCuSO<sub>4</sub>中の約2mMの酢酸から出発して40mMの酢酸/6Mの尿素/1mMのグリシン/20μMのCuSO<sub>4</sub>（pH約4）に到達する勾配を用いて、約8個から約12個のシアル酸を含むイソ形をカラムから溶

出させる。勾配の総容量はカラム容量の約40倍であり、約1カラム容量の各分画を容器に収集する。この容器は、収集した分画が低pHに長期間接触することを防止するために、pHを6～8.5の範囲に維持する十分な量のTris緩衝液を収容している。分画のアリコート进行分析用等電点

電気泳動にかけて分離をモニターする。

図4は、この手順によって達成されたイソ形8～11の分離を示す。勾配の終端でカラムに結合して維持されたイソ形12～14は、10mMのTris-HCl、140mMのNaCl、20mMのCuSO<sub>4</sub> (pH7.0) から成る緩衝液で洗浄することによって溶出させる。(勾配中で分離したかまたは塩化ナトリウム溶液によって溶出した) イソ形を、La iらの実施例2に記載のような逆相クロマトグラフィー及びゲル濾過クロマトグラフィーで順次処理して夾雑タンパク質を除去する。

#### 実施例6：ヒトエリトロポエチン類似体の構築

ヒトエリトロポエチンアミノ酸配列内部の既存の炭水化物結合部位の位置を図5に示す (SEQ ID NO : 26)。エリトロポエチンの付加的グリコシレーション部位の作製手順を図6A-Cに要約し以下に説明する。

in vitro突然変異誘発に使用するために以下のオリゴヌクレオチドプライマーを合成した。

[Asn<sup>4</sup>, Ser<sup>6</sup>] EPO : 5' CGCCACCAAACTCAGCTGTGACAGCCGA3'

(SEQ ID NO : 1)

[Asn<sup>9</sup>, Ser<sup>11</sup>] EPO : 5' ATCTGTACAACCGAAGCCTGGAGAGGT3'

(SEQ ID NO : 2)

[Asn<sup>69</sup>] EPO : 5' GGGCCTGGCCAACCTGTCGGAAG3'

(SEQ ID NO : 3)

[Asn<sup>124</sup>] EPO : 5' TCCCCTCCAGATAAATGCCTCAGCTGCC3'

(SEQ ID NO : 4)

[Asn<sup>125</sup>, Ser<sup>127</sup>] EPO : 5' CAGATGCCAACTCATCTGCTCCAC3'

(SEQ ID NO : 5)

[Asn<sup>163</sup>, Ser<sup>165</sup>] EPO :

5' AGGCCTGCAGGAATGGGAGCAGATGACCAGGTG3'

(SEQ ID NO : 6)

[Thr<sup>125</sup>] EPO : 5' TCCAGATGCCACCTCAGCTGCTC3'

(SEQ ID NO : 7)

[Pro<sup>124</sup>, Thr<sup>125</sup>] EPO : 5' CCTCCAGATCCGACCTCAGCTGC3'

(SEQ ID NO : 8)

下線を付したコドンは、野生型アミノ酸が括弧内のアミノ酸によって置換された不適正領域を示す。

Asn4にN-グリコシレーション部位を付加するために [Asn4, Ser<sup>6</sup>] EPOを構築した。Asn9にN-グリコシレーション部位を付加するために [Asn<sup>9</sup>, Ser<sup>11</sup>] EPOを構築した。Asn69にN-グリコシレーション部位を付加するために [Asn<sup>69</sup>] EPOを構築した。Asn125にN-グリコシレーション部位を付加するた

めに [Asn<sup>125</sup>, Ser<sup>127</sup>] EPOを構築した。Thr125にO-グリコシレーション部位を付加するために [Thr<sup>125</sup>] EPO及び [Pro<sup>124</sup>, Thr<sup>125</sup>] EPOを構築した。

in vitro突然変異誘発に使用するために以下のオリゴヌクレオチドプライマーを合成した。

[Asn<sup>69</sup>, Thr<sup>71</sup>] EPO : 5' GGGCCTGGCCAACCTGACAGAAGCTGTC3'

(SEQ ID NO : 9)

[Ser<sup>68</sup>, Asn<sup>69</sup>, Thr<sup>71</sup>] EPO :

5' CAGGGCCTGTCCAACCTGACAGAAGCTGTC3'

(SEQ ID NO : 10)

[Asn<sup>125</sup>, Thr<sup>127</sup>] EPO : 5' CAGATGCCAACTCAACGGCTCCAC3'

(SEQ ID NO : 11)

[Asn<sup>125</sup>, Thr<sup>127</sup>, Thr<sup>131</sup>] EPO :

5' ATGCGAACTCAACGGCTCCACTCACAACAATCACT3'

(SEQ ID NO : 12)

[Pro<sup>124</sup>, Asn<sup>125</sup>, Ser<sup>127</sup>] EPO :

5' CCAGATCCAAATTCATCTGCTCCACTC3'

(SEQ ID NO : 13)

[Pro<sup>124</sup> , Asn<sup>125</sup> , Thr<sup>127</sup> ] EPO :

5' CCAGATCCAAATTCACAGCTCCACTC3'

(SEQ ID NO : 14)

[Thr<sup>125</sup> , Thr<sup>126</sup> ] EPO : 5' CCAGATGCGACAACAGCTGCTCCA3'

(SEQ ID NO : 15)

[Pro<sup>124</sup> , Thr<sup>125</sup> , Thr<sup>126</sup> , Thr<sup>131</sup> ] EPO :

[Pro<sup>124</sup> , Thr<sup>125</sup> ] EPO cDNAから出発し、オリゴヌクレオチドプライマー5' AGATCCGACCACCGCTGCTCCAC3' (SEQ ID. NO : 16) を使用して、[Pro<sup>124</sup> , Thr<sup>125</sup> , Thr<sup>126</sup> ] EPOを作製する。次にオリゴヌクレオチドプライマー5' TGCTCCACTCACACAATCACTG3' (SEQ ID. : 17) を使用して、[Pro<sup>124</sup> , Thr<sup>125</sup> , Thr<sup>126</sup> , Thr<sup>131</sup> ] EPOを作製する。

Asn<sup>69</sup>にN-グリコシレーション部位を付加しこの部位のN-グリコシレーションを強化するために [Asn<sup>69</sup> , Thr<sup>71</sup> ] EPO及び [Ser<sup>68</sup> , Asn<sup>69</sup> , Thr<sup>71</sup> ] EPOを構築する。Asn<sup>125</sup>にN-グリコシレーション部位を付加しこの部位のグリコシレーションを強化するために [Asn<sup>125</sup> , Thr<sup>127</sup> ] EPO、[Asn<sup>125</sup> , Thr<sup>127</sup> , Thr<sup>131</sup> ] EPO、[Pro<sup>124</sup> , Asn<sup>125</sup> , Ser<sup>127</sup> ] EPO及び [Pro<sup>124</sup> , Asn<sup>125</sup> , Thr<sup>127</sup> ] EPOを構築する。Thr<sup>125</sup>にO-グリコシレーション部位を付加しこの部位のグリコシレーションを強化するために、[Thr<sup>125</sup> , Thr<sup>126</sup> ] EPO及び [Pro<sup>124</sup> , Thr<sup>125</sup> , Thr<sup>126</sup> ,

Ser<sup>131</sup> ] EPOを構築する。

in vitro突然変異誘発用エリトロポエチンDNAのソースは、プラスミドHu13、pUC8中のヒトエリトロポエチンcDNAクローンであった (Lawら、Proc Natl. Acad. Sci. 83, 6920 (1986) )。Hu13に由来のプラスミドDNAを、BstEII及びBglII制限酵素で消化し、得られたDNAフラグメントをアガロースゲル電気泳動にかけ、810塩基対 (bp) のエリトロポエチンDNAフラグメントを、GeneClean™ キット及び製造業者によって提供された手順 (BIO 101, Inc. ) を用いてゲルから単離



した。Lin特許、前出、に記載されているように、プラスミドpBRgHuEP0は、エリトロポエチンゲノム遺伝子をpBR322の誘導体に挿入されたBamHIフラグメントとして含む。pBRgHuEP0を同じくBstEII及びBglIIで消化し、6517bpのベクターフラグメントを回収した。2つのフラグメントを結合してIGT1が得られた。pEC-1を構築するために、pDSVL (Lin特許、前出、に記載及び図5Bに図示) をBamHIで消化し、エリトロポエチンcDNA含有のIGT1に由来の2.8キロ塩基 (kb) の単離BamHIフラグメントをIGT1に結合した。

in vitro突然変異誘発用の一本鎖DNAを作製するために、pEC-1をBamHI及びBglIIで消化し、820bpのエリトロポエチ

ンcDNAフラグメントを単離した。このフラグメントをm13mp18のBamHI部位に結合してm13-EC-1を作製した。Kunkelら、Methods in Enzymol. 154, 367 (1987) 及びMessing、Methods in Enzymol. 101, 20 (1983) に記載された手順でm13-EC-1に感染させた大腸菌RZ1032株の上清から一本鎖DNAを回収した。in vitro突然変異誘発のために、約1  $\mu$ gの一本鎖DNAと0.2ピコモルの上記合成プライマーの1つとを、6  $\mu$ lの緩衝液 (250mMのTris, pH7.8、50mMのMgCl<sub>2</sub>及び50mMのジチオトレイトール) と混合した。プライマーを鋳型にアニーリングするために、反応容量を水で10  $\mu$ lに調整し、混合物を65℃で5分間加熱し、次いで室温まで放冷した。伸長反応のために、各2.5  $\mu$ lのdTTP、dATP、dGTP、dCTP及びATP (すべて10  $\mu$ M) を添加し、次いで1  $\mu$ l (1単位) の大腸菌DNAポリメラーゼ (Klenowフラグメント) と1  $\mu$ l (1単位) のT4 DNAリガーゼとを添加した。次に混合物を14℃で一夜インキュベートし、記載された手順 (Messing、前出) で大腸菌JM109 (Yanisch-Perronら、Gene 33, 103 (1985) ) の形質転換に使用した。

識別用ハイブリダイゼーションによって突然変異クローンを同定するために、栄養寒天上のプラークをGene Screen フィルター (New England Nuclear) に移した。フィルターを加熱ランプ下に乾燥し、次いで1%SDS含有の6×SSC中で60℃で1時間インキュベートした。ハイブリダイゼーションのために、上記オリゴヌクレオチドプライマー (8ピコモル

）を、T4ポリヌクレオチドキナーゼ及び $\gamma$ - $^{32}$ P-標識ATPで末端標識し、フィルターと共に $6\times$ SSC、0.5%SDS及び100mg/mlのサケ精子DNA中で、[Asn<sup>124</sup>] 突然変異のためには37℃、[Asn<sup>4</sup>, Ser<sup>6</sup>] 突然変異のためには55℃、[Thr<sup>125</sup>] 及び [Pro<sup>124</sup>, Thr<sup>125</sup>] 突然変異のためには65℃並びに [Asn<sup>9</sup>, Ser<sup>11</sup>] 及び [Asn<sup>163</sup>, Ser<sup>165</sup>] 突然変異のためには70℃で、一夜インキュベートした。翌日、フィルターを $6\times$ SSCによって室温で3回洗浄し、オートラジオグラフィーにかけた。必要な場合には、野生型エリトロポエチンcDNA配列を有するプラークへのハイブリダイゼーションがほとんどまたは全く検出されなくなるまで温度を上げながら $6\times$ SSC中でフィルターを洗浄した。これらの条件下で陽性のハイブリダイゼーションシグナルを与えたクローンを同定し、純粋なクローンを単離するためにJM109に再度トランスフェクトした。ジデオキシチェンターミネーション配列分析は、アスパラギン、セリン、トレオニン及びプロリン残基への突

然変異が存在することを示した。

[Asn<sup>4</sup>, Ser<sup>6</sup>]、[Asn<sup>9</sup>, Ser<sup>11</sup>]、[Asn<sup>69</sup>]、[Asn<sup>124</sup>]、[Asn<sup>125</sup>]、[Ser<sup>127</sup>]、[Asn<sup>163</sup>, Ser<sup>165</sup>]、[Thr<sup>125</sup>] 及び [Pro<sup>124</sup>, Thr<sup>125</sup>] のような変異を含む二本鎖m13-EC-1 DNAを沸騰法 (Holmesら、Anal. Biochem 117, 193 (1981)) によって、トランスフェクトJM109細胞から回収した。DNAをBstEII及びXhoIIによって消化し、810bpのエリトロポエチンDNAフラグメントを単離した。pEC-1をBstEIIで消化し次いでBglIIで部分消化し、得られたフラグメントの5' 末端を、10mMのTris, pH8中の細菌性アルカリホスファターゼによって60℃で60分間脱リン酸処理した。810bpのBstEII-BglIIフラグメントが欠失した7 kbのベクターフラグメントを単離し、上記のエリトロポエチンフラグメントに結合した。得られたプラスミド (pEC-Xと命名、このXは類似体番号) は指定位置に変異アミノ酸残基を有するエリトロポエチン類似体をコードするDNAを含んでいる。

または、アミノ酸残基41-55を欠失させるin vitro突然変異誘発によってエリトロポエチン類似体 (pEC34) を構築した。この結果としては、より小さい (775 bp) のEPO含有BstEII-BglIIフラグメントが得られた。このフラグメントを

上述のようにpEC1に挿入した。エリトロポエチン類似体をクローニングするために、上述のようにpEC34をBstEIIで消化し、BglIIで部分消化し、脱リン酸化し、ベクターを単離した。7 kbのベクターフラグメントを次に、上記のエリトロポエチンフラグメントに結合した。pEC34と共にクローニングすることによって組換え体と単なる再閉鎖とを容易に識別し得る。再閉鎖の場合には類似体よりも小さいBstEII-BglIIフラグメントが生じ、これらはアガロースゲル上で識別が容易である。

これらの汎用手順を使用して表3、4及び5に示すエリトロポエチン類似体を構築した。各類似体毎にDNA配列変異を示している。また、突然変異誘発に使用したオリゴヌクレオチドプライマーはヒトエリトロポエチンの配列に相補性の配列を有していた。

表 3

N結合炭水化物鎖部位を有する  
エリトロポエチン類似体

類似体 No.	アミノ酸置換	配列変異
N1	Asn <sup>4</sup> Ser <sup>6</sup>	CGC→AAC ATC→AGC
N2	Asn <sup>9</sup> Ser <sup>11</sup>	AGC→AAC GTC→AGC
N3	Asn <sup>19</sup> Thr <sup>21</sup>	GCC→AAC GAG→ACG
N4	Asn <sup>30</sup> Thr <sup>32</sup>	GCT→AAT CAC→ACG
N5	Asn <sup>42</sup>	CCA→AAT
N6	Ser <sup>42</sup> Asn <sup>43</sup> Thr <sup>45</sup>	CCA→TCA GAC→AAC AAA→ACA
N7	Ser <sup>49</sup>	TAT→TCT
N8	Asn <sup>51</sup> Thr <sup>53</sup>	TGG→AAT AGG→ACG
N9	Asn <sup>57</sup> Thr <sup>59</sup>	GGG→AAC CAG→ACG
N10	Asn <sup>69</sup>	CTG→AAC
N11	Asn <sup>69</sup> Thr <sup>71</sup>	CTG→AAC TCG→ACA
N12	Ser <sup>68</sup> Asn <sup>69</sup> Thr <sup>71</sup>	N11 plus GCC→TCC
N13	Asn <sup>88</sup> Thr <sup>90</sup>	TGG→AAT CCC→ACC
N14	Ser <sup>87</sup> Asn <sup>88</sup> Thr <sup>90</sup>	N13 plus CCG→TCG
N15	Ser <sup>87</sup> Asn <sup>88</sup> Thr <sup>90</sup> Thr <sup>92</sup>	N14 plus CAG→ACG

表 3 (続き)

N結合炭水化物鎖部位を有する  
エリトロポエチン類似体

類似体 No.	アミノ酸置換	配列変異
N16	Ser <sup>87</sup> Asn <sup>88</sup> Thr <sup>90</sup> Ala <sup>162</sup>	N14 plus AGG→GCC
N17	Asn <sup>88</sup> Ser <sup>90</sup>	TGG→AAT CCC→TCC
N18	Val <sup>87</sup> Asn <sup>88</sup> Thr <sup>90</sup>	CCG→GTG TGG→AAT CCC→ACC
N19	Ser <sup>87</sup> Asn <sup>88</sup> Gly <sup>89</sup> Thr <sup>90</sup>	CCG→TCG TGG→AAT GAG→GGG CCC→ACC
N20	Asn <sup>89</sup> Ile <sup>90</sup> Thr <sup>91</sup>	GAG→AAC CCC→ATC CTG→ACG
N21	Ser <sup>87</sup> Asn <sup>89</sup> Ile <sup>90</sup> Thr <sup>91</sup>	N20 plus CCG→TCG
N22	Asn <sup>113</sup> Thr <sup>115</sup>	GGA→AAC CAG→ACG
N23	Asn <sup>118</sup> Val <sup>121</sup>	GCC→AAC CCT→GTT
N24	Asn <sup>121</sup> Ser <sup>122</sup> Thr <sup>123</sup>	CCT→AAT CCA→TCA GAT→ACT
N25	Asn <sup>124</sup>	GCG→AAT
N26	Ser <sup>122</sup> Asn <sup>124</sup>	CCA→TCA GCG→AAC
N27	Asn <sup>125</sup> Ser <sup>127</sup>	GCC→AAC GCT→TCT
N28	Asn <sup>125</sup> Thr <sup>127</sup>	GCC→AAC GCT→ACG

表 3 (続き)

N結合炭水化物鎖部位を有する  
エリトロポエチン類似体

類似体 No.	アミノ酸置換	配列変異
N29	Leu121Ser122Asn125Thr127	N28 plus CCT→CTT
N30	Thr120Gly122Leu123Asn125Thr127	CCA→TCA N28 plus TCC→ACC CGC→GGG GAT→CTC
N31	Asn126Ser128	TCA→AAT GCT→TCT
N32	Asn126Thr128Val129	TCA→AAT GCT→ACT CCA→GTA
N33	Leu121Ser122Asn126Thr128Val129	N32 plus CCT→CTT
N34	Thr121Gly123Ser125Asn126Thr128Val129	CCA→TCA N32 plus CCT→ACG GAT→GGG GCC→TCC
N35	Ser129Asn130	CCA→AGC CTC→AAC
N36	Asn132	ACA→AAC
N37	Asn134Thr136	ACT→AAT GAC→ACC
N38	Asn135	GCT→AAT
N39	Asn136Thr138	GAC→AAC TTC→ACC
N40	Asn137Thr139	ACT→AAT CGC→ACC
N41	Asn138Thr140	TTC→AAC AAA→ACA

表 3 (続き)

N結合炭水化物鎖部位を有する  
エリトロポエチン類似体

類似体 No.	アミノ酸置換	配列変異
N42	Asn144	GTC→AAC
N43	Ser143Thr149Val150	TTC→TCC
		CTC→ACC
		CGG→GTG
N44	Gly148Thr149	TTC→GGC
		CTC→ACC
N45	Asn155	CTG→AAT
N46	Asn163Ser165	ACA→AAT
N47	Asn30Thr32Val87Asn88Thr90	N4 and N18
N48	Asn69Thr71Ser87Asn88Thr90	N11 and N14

表 4  
O結合炭水化物鎖部位を有する  
エリトロポエチン類似体

類似体 No.	アミノ酸置換	配列変異
01	Ser <sup>6</sup>	ATC→AGC
02	Ser <sup>7</sup>	TGT→TCC
03	Ser <sup>8</sup>	GAC→AGC
04	Ser <sup>11</sup>	GTC→TCT
05	Ser <sup>18</sup>	GAG→TCG
06	Ser <sup>23</sup>	GAG→TCG
07	Ser <sup>29</sup>	TGT→AGC
08	Ser <sup>29</sup>	TGT→TCT
09	Ser <sup>30</sup>	GCT→TCT
010	Ser <sup>33</sup>	TGC→TCA
011	Ser <sup>37</sup>	GAG→TCG
012	Ser <sup>49</sup>	TAT→TCT
013	Ser <sup>61</sup>	GTA→TCA
014	Ser <sup>63</sup>	GTC→TCC
015	Ser <sup>67</sup>	CTG→TCG
016	Ser <sup>68</sup>	GCC→TCC
017	Ser <sup>70</sup>	CTG→TCG
018	Ser <sup>73</sup>	GCT→TCT
019	Ser <sup>74</sup>	GTC→TCT
020	Ser <sup>75</sup>	CTG→TCG
021	Ser <sup>79</sup>	GCC→TCC
022	Ser <sup>81</sup>	TTG→TCG
023	Ser <sup>86</sup>	CAG→TCG
024	Ser <sup>87</sup>	CCG→TCG
025	Ser <sup>93</sup>	CTG→TCG
026	Ser <sup>98</sup>	GCC→TCC
027	Ser <sup>99</sup>	GTC→TCC
028	Ser <sup>102</sup>	CTT→TCT
029	Ser <sup>103</sup>	CGC→AGT



表 4 (続き)

○結合炭水化物鎖部位を有する  
エリトロポエチン類似体

類似体 No.	アミノ酸置換	配列変異
030	Ser105	CTC→AGC
031	Ser109	CTT→TCT
032	Ser111	GCT→TCT
033	Ser112	CTG→TCG
034	Ser114	GCC→TCC
035	Ser128	GCT→TCT
036	Ser159	TCG→GAG
037	Ser161	TGC→TCC
038	Pro125Ser127	GCC→CCC
		GCT→TCT
039	Thr62	GAA→ACA
040	Thr64	TGG→ACG
041	Thr65	CAG→ACG
042	Thr88	TGG→ACG
043	Thr90	CCC→ACC
044	Thr92	CAG→ACG
045	Thr100	AGT→ACT
046	Thr110	CGG→ACG
047	Thr115	CAG→ACG
048	Thr123	GAT→ACT
049	Thr124	GCG→ACG
050	Thr125	GCC→ACC
051	Thr125Ser127	GCC→ACC
		GCT→TCT
052	Thr125Thr126	GCC→ACA
		TCA→ACA
053	Thr126	TCA→ACC
054	Thr127	GCT→ACT
055	Thr130	CTC→ACC

表 4 (続き)  
O結合炭水化物鎖部位を有する  
エリトロポエチン類似体

類似体 No.	アミノ酸置換	配列変異
056	Thr131	CGA→ACA
057	Thr136	GAC→ACC
058	Thr140	AAA→ACA
059	Pro124Thr125	GCG→CCG GCC→ACC
060	Pro124Thr125Thr126	059 plus TCA→ACC
061	Pro124Thr125Thr126Thr131	060 plus CGA→ACA
062	HCG C-末端延長部	

表 5

N-結合及びO-結合炭水化物鎖部位を有するエリトロポエチン類似体

類似体番号	アミノ酸置換	配列変異
N01	Ser <sup>87</sup> Asn <sup>88</sup> Thr <sup>90</sup> HCG C-末端延長部	N14及び062
N02	Asn <sup>90</sup> Thr <sup>92</sup> Val <sup>87</sup> Asn <sup>88</sup> Thr <sup>90</sup> HCG C-末端延長部	N47及び062

プラスミドpDS $\alpha$ 2の誘導体であるpDEC $\Delta$ にエリトロポエチンcDNAを挿入することによってpDEC-X (Xは類似体番号) と命名されたプラスミドを構築した。発現ベクターpDS $\alpha$ 2はPCT特許出願No. WO90/14363に概説されている。pDEC $\Delta$ はpDS $\alpha$ 2から以下の段階によって誘導された。

(1) pDS $\alpha$ 2のDNAをHindIIIで消化し、HindIII付着末端を大腸菌のDNAポリメラーゼ (Klenowフラグメント) 及びdNTPで処理し、平滑末端化ベクターを再結合することによって、pDS $\alpha$ 2のHindIII部位を欠失させた。得られたプラスミドはp

DS $\alpha$ 2 $\Delta$ Hであった。

(2) pDS $\alpha$ 2 $\Delta$ HをSalIで消化し、これに、SV40スプライスシ

グナルをスプライスシグナルの3' 端に結合したSalIリンカーと共に有する合成オリゴヌクレオチドを結合した。合成オリゴヌクレオチドは以下の配列 (SEQ ID NO: 18) を有していた。

```
5' TCGAGGAAGTAAAAACCAGAAAGTTAACTGGTAAGTTTAGT
CTTTTGTCTTTTATTTTCAGGTCCCGGATCCGGTGGTGGTCAAATCA
AAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTCTAGGCCTGTACGG
AAGTGTTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCTGCAACAAGCTGGTCGACC3'
```

得られたプラスミドはpDS $\alpha$ 2 $\Delta$ Hスプライスであった。

(3) pDS $\alpha$ 2 $\Delta$ HスプライスをSalIで消化し、T4 DNAポリメラーゼ及びdNTPで付着末端を処理することによって平滑末端化した。820bpのBamHI-BglIIヒトエトロポエチンcDNAフラグメントを同じ方法で平滑末端化し、プラスミドに結合した。得られたプラスミドはpDEC-1であった。

(4) pDECをKpnI及びPvuIIで消化し、付着末端をmung beanスクレアーゼで処理することによって平滑末端化した。切除したKpnI-PvuIIフラグメントを欠失させるためにプラスミドを再結合させてプラスミドpDEC $\Delta$ を得た。

BstEIIで完全消化し次いでBglIIで部分消化することによってpDEC $\Delta$ からpDEC-Xプラスミドを作製した。エリトロ

ポエチンコーディング配列の欠失したベクターフラグメントを単離し、所望のプラスミドを含む810bpのBstEII-BglIIフラグメントに結合した。

複数のアミノ酸変異を有するいくつかの類似体の構築を以下に詳細に説明する。

#### pDEC (N47) 及びpDEC (N48) の構築

asn30 thr32 val187 asn88及びthr90突然変異を含むpDEC (N47) を、pDEC (N18) 及びpDEC (N4) から構築した。pDEC (N18) をHindII及びBglIIで消化し、445bpのフラグメントを単離した。pDEC (N4) をBstEII及びHindIIIで消化し、377bp

のフラグメントを単離した。これらの2つのフラグメントを、上述のようにBstE II及びBglIIで切断したpDEC Δに結合してpDEC (N47)を得た。

asn69 thr71 ser87 asn88及びthr90突然変異を含むpDEC (N48) を、pDEC (N14) 及びpDEC (N11) から構築した。pDEC (N14) をHindII及びBglIIで消化し、445 bpのフラグメントを単離した。pDEC (N11) をBstEII及びHindIIで消化し、377bpのフラグメントを単離した。これらの2つのフラグメントを、上述のようにBstE II及びBglIIで切断したpDEC Δに結合してpDEC (N48)を得た。

#### pDEC (062) の構築 (HCG-エリトロポエチン融合)

pEC1と、ヒト絨毛性ゴナドトロピンのカルボキシ末端の28個のアミノ酸 (ser-ser-ser-lys-ala-pro-pro-pro-ser-leu-pro-ser-pro-ser-arg-leu-pro-gly-pro-ser-asp-thr-pro-ile-leu-pro-gln) (SEQ ID. NO: 25) (Pierceら, Ann. Rev. Biochem. 50, 465 (1981)) を含む107塩基対のStuI-BglII合成DNAリンカーとからpDEC (062) を組立てた。リンカーの配列を以下に示す。

5' CCTGTAGGACAGGGGACAGATCCTCTTCTCAAAGGCCCTCCCCCAGCCTTC-

3' GGACATCTGTCCCTGTCTAGGAGAAGGAGTTTCCGGGAGGGGGTCCGAAG-

5' CAAGTCCATCCCGACTCCCGGGGCCCTCGGACACCCCGATCCTCCACAATGA

(SEQ ID. NO: 19)

3' GTTCAGGTAGGCTGAGGGCCCCGGGAGCCTGTGGGCTAGGAGGCTTACTCTA

G (SEQ ID. NO: 20)

pEC1をStuI及びBglIIで消化し、610bpのDNAフラグメントを単離した。合成リンカーをATP及びポリヌクレオチドキナーゼによってリン酸化し、pEC1フラグメントと共に、上述のように予めBstEIIで消化しBglIIで部分消化したpDEC Δに結合した。

#### pDEC (N01) の構築

pDEC (062) (HCG-EPO) 及びpDEC (N14) (Ser<sup>87</sup> Asn<sup>88</sup> Thr<sup>90</sup>) からpDEC (N01) を組立てた。pDEC177をStuI及びBglIIで消化し、Ser<sup>87</sup> Asn<sup>88</sup> Thr<sup>90</sup> 突然変異を含む610bpのDNAフラグメントをgene-cleanで単離した。pDEC (062) をStuI及びB

glIIで消化し、107塩基対のフラグメントを単離した。これらの2つのDNAフラグメントを、上述のように予めBstEIIで消化しBglIIで部分消化したpDEC Δに結合した。

#### pDEC (N02) の構築

pDEC (062) (HCG-EPO) 及びpDEC (N47) (Asn<sup>30</sup> Thr<sup>32</sup> Val<sup>87</sup> Asn<sup>88</sup> Thr<sup>90</sup>) から pDEC (N02) を組立てた。pDEC (N47) をStuI及びBglIIで消化し、Asn<sup>30</sup> Thr<sup>32</sup> Val<sup>87</sup> Asn<sup>88</sup> Thr<sup>90</sup> 突然変異を含む610bpのDNAフラグメントを、GeneClean™ で単離した。pDEC (062) をStuI及びBglIIで消化し、107塩基対のフラグメントを単離した。これらの2つのDNAフラグメントを、上述のように予めBstEIIで消化しBglIIで部分消化したpDEC Δに結合した。

#### pDEC (N16) (Ser<sup>87</sup> Asn<sup>88</sup> Thr<sup>90</sup> Ala<sup>162</sup>) の構築

pDEC (N14) (Ser<sup>87</sup> Asn<sup>88</sup> Thr<sup>90</sup>) 及びpDEC258 (Ala<sup>162</sup>) から pDEC (N16) を組立てた。pDEC258は上述のin vitro突然変異

誘発手順を用いて構築し、162位のAGGコドンにGCGに変異させた。pDEC (N14) をStuI及びBglIIで消化し、Ser<sup>87</sup> Asn<sup>88</sup> Thr<sup>90</sup> 突然変異を含む610bpのDNAフラグメントをGeneClean™ で単離した。pDEC258をStuI及びBglIIで消化し、210塩基対のフラグメントを単離した。これらの2つのDNAフラグメントを、上述のように予めBstEIIで消化しBglIIで部分消化したpDEC Δに結合した。

#### pDEC (R1) 、 (R2) 及び (R3) の構築

pDEC (N14) からグリコシレーション部位を除去するために、ser<sup>87</sup> asn<sup>88</sup> 及び thr<sup>90</sup> 突然変異を含むm13-EPO (N14) を、以下のプライマーを用いて上述のようにin vitro突然変異誘発した。

5' GCAGCCGAGCAGATCAGACGG3' GLN24

(SEQ ID. NO : 21)

5' CTTGAATGAGCAGATCACTGTCC3' GLN38

(SEQ ID. NO : 22)

5' CTGTTGGTCCAGTCTTCCAG3' GLN83

(SEQ ID. NO : 23)

得られたプラスミドを、pDEC (R1) (gln<sup>24</sup> ser<sup>87</sup> asn<sup>88</sup> thr<sup>90</sup>)、pDEC (R2) (gln<sup>38</sup> ser<sup>87</sup> asn<sup>88</sup> thr<sup>90</sup>) 及びpDEC (R3) (gln<sup>83</sup>

ser<sup>87</sup> asn<sup>88</sup> thr<sup>90</sup>) と命名した。また、m13EC-1を上記オリゴヌクレオチドプライマーでin vitro突然変異誘発すると、pEC10 (gln<sup>24</sup>) 及びpEC8 (gln<sup>38</sup>) が得られた。プライマー

5' CCTGTTGCTCCAGTCTCCAGC3' GLN83

(SEQ ID. NO : 24)

を用いてpEC9 (gln<sup>83</sup>) を構築した。

ヒトエリトロポエチンのcDNAクローン、[Asn<sup>4</sup>, Ser<sup>6</sup>] EPO、[Asn<sup>9</sup>, Ser<sup>11</sup>] EPO、[Asn<sup>69</sup>] EPO、[Asn<sup>124</sup>] EPO、[Asn<sup>125</sup>, Ser<sup>127</sup>] EPO、[Asn<sup>163</sup>, Ser<sup>165</sup>] EPO、[Thr<sup>125</sup>] EPO及び[Pro<sup>124</sup>, Thr<sup>125</sup>] EPOに対応する類似体のcDNAクローン、並びに、表3、4及び5に記載の類似体のcDNAクローンを、エレクトロポレーションによってCOS-1細胞 (ATCC NO. CRL-1650) に移入した。半集密状態のシャーレからCOS-1細胞を採取し、培地 (5%のウシ胎仔血清と1%のL-グルタミン/ペニシリン/ストレプトマイシン (Irvine Scientific) とを含むダルベッコの改良必須培地) で洗浄し、4×10<sup>6</sup>細胞/mlで再浮遊させた。1mlの細胞をエレクトロポレーションキュベット (Bio-Rad) に移し、100~200μgの担体DNAと2~20μgのエリトロポエチン類似体コーディングプラスミドDNAとの存在下に、25μファラッド及び1600ボルトでBio-Rad Gene Pulserによつ

てエレクトロポレートした。エレクトロポレートした細胞を5mlの培地中で60mmの組織培養皿あたり2×10<sup>6</sup>細胞で平板培養した。2~4時間の平板培養後、培地を5mlの新鮮培地に交換した。エレクトロポレーションの3~5日後に馴化培地を収集した。

#### 実施例7：エリトロポエチン類似体のキャラクタリゼーション

##### A. 炭水化物付加の測定

実施例6に記載のようなエリトロポエチン類似体cDNAでトランスフェクトしたCOS細胞から得られた5~20単位を含有する量のCOS細胞上清を、ウサギ抗エリト

ロポエチンポリクローナル抗体と共に室温で一夜免疫沈降させた。リン酸塩緩衝生理食塩水 (PBS) 中の20~80  $\mu$ lの1:1プロテインA-セファロースを免疫沈降物に添加し、室温で1時間インキュベートした。試料を遠心し、PBSで洗浄し、指示されている場合にはN-結合炭水化物鎖を除去するためにペレットをN-グリカナーゼで処理した。試料を、15%SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分析し、ニトロセルロースに移し、マウス抗エリトロポエチンモノクローナル抗体混合物を用いて文献に記載のウェスタン分析 (Burnetteら、*Anal. Biochem.* 112, 195-203 (1981) ; Elliottら、*Gene* 79, 167-180 (1989) ) によって処理した。このような抗体の1つ、9G8Aは、Elliottら、(1989) *Blood* 74, Supp. 1, A. 1228に記載されている。

[Asn<sup>69</sup>] EPO及び [Asn<sup>125</sup>, Ser<sup>127</sup>] EPOのcDNAでトランスフェクトしたCOS細胞上清の分析によれば、ヒト配列エリトロポエチンに比べてタンパク質サイズが増大していた。このサイズ増加は、付加的なN-結合炭水化物鎖の指標となる (図7)。

[Thr<sup>125</sup>] EPO及び [Pro<sup>124</sup>, Thr<sup>125</sup>] EPOのcDNAでトランスフェクトしたCOS細胞上清をN-グリカナーゼで処理すると、ヒト配列エリトロポエチンに比べてタンパク質サイズが増大していることが判明した。このサイズ増加は、付加的なO-結合炭水化物鎖の指標となる (図8)。選択されたその他の類似体のウェスタンブロット分析を図10に示す。

EPOに結合したN-結合炭水化物鎖の数を測定するために、N-グリカナーゼによる部分消化を実施した。類似体またはrHuEPOをCHO細胞中で発現させ、無血清の馴化培地を収集した。試験管に40単位のEPO (H<sub>2</sub>Oで15  $\mu$ lの量に調整) を入れ、各試験管に10  $\mu$ lの0.5%SDSを添加し、各試料を3分間沸騰

させた。次いで、以下の成分、即ち10.8  $\mu$ lの0.5MのNaPO<sub>4</sub>, pH8.6、5  $\mu$ lの7.5%のnonidet P40及び1.5  $\mu$ lの250単位/mlのN-グリカナーゼ (Genzyme) を添加した。試料を37℃で指定時間インキュベートした。SDS-PAGE試料緩衝液 (上記参照) を添加して反応を停止させ、次いで抗EPOポリクローナル抗体及び抗ウサギVecta

stain™ キット (Vector laboratories) を用い、4-クロロナフトールを基質として SDS-PAGE ウェスタン分析 (10% アクリルアミド) 処理した。この方法によるヒトエритроポエチン及び類似体 N14 の N-結合鎖の分析を図 11 に示す。

#### B. エリトロポエチン類似体活性アッセイ

Egrie ら、前出、に従って RIA を実施した。CLINIGEN™ EIA キット (R 及び D システム) を製造業者から提供された手順で用いて EIA を実施した。低酸素症でない赤血球増加症マウスのバイオアッセイ (Cotes ら、前出) を用い、エリトロポエチン類似体を発現する CHO 細胞の上清または後述するような CHO 細胞馴化培地から得られた精製エリトロポエチンを用いてエリトロポエチン類似体の *in vivo* 生物活性を測定した。

Iscove ら、J. Cell Physiol. 83, 309-320 (1974) に記載

の方法に修正を加えた赤血球系コロニー形成アッセイによって、*in vitro* エリトロポエチン活性を測定した。ヒト骨髓細胞の単核細胞を、ficoll-paque クッションで部分精製し、Iscove 培地中で洗浄後、付着細胞を除去するために平板培養した。培養培地は 0.9% のメチルセルロースを含有していたがウシ血清アルブミンは全く含んでいなかった。8~10 日間培養後に赤血球系コロニー数を測定した。

実施例 6 に記載のような COS 細胞にトランスフェクトされ発現されたエリトロポエチン類似体を、粗 COS 細胞上清中で RIA、EIA 及び赤血球系コロニー形成アッセイを用いて分析した。これらのアッセイによれば、精製ヒト配列エリトロポエチンは、RIA 活性と同等の *in vitro* 活性を有している。類似体 [Asn<sup>69</sup>] EPO、[Thr<sup>125</sup>] EPO 及び [Pro<sup>124</sup>, Thr<sup>125</sup>] EPO は RIA 活性と同等の *in vitro* 活性を示し、これは (前項 A で測定したような) 付加的炭水化物鎖を有する証拠となる。[Thr<sup>125</sup>] EPO 及び類似体 N4、N11、N14、N16、N18、N47、N48、O62、N01 及び N02 を更に分析するために、エリトロポエチン類似体をコードする cDNA クローンを CHO 細胞にトランスフェクトし、CHO 細胞上清を RIA または EIA 及び *in vivo* 生物アッセイにかけた。結果を表 6 に示す。CHO 細胞

上清中で発現された類似体 R1、R2 及び R3 の *in vivo* 活性を表 7 に示す。



表 6  
付加的炭水化物鎖を有する  
エリトロポエチン類似体

EPO 配列	N-結合鎖 <sup>a</sup>	O-結合鎖	In Vivo <sup>b</sup> 活 性 RIA または BIA
ヒト	3 <sup>c</sup>	1 <sup>d</sup>	0.6
Asn30Thr32	3 ~ 4 <sup>c</sup>	n.t.	1.1
Asn51Thr53	4	n.t.	n.t.
Asn57Thr59	4	n.t.	n.t.
Asn69	4	減少 <sup>e</sup>	n.t.
Asn69Thr71	4	n.t.	0.25-0.7
Ser68Asn69Thr71	4	n.t.	n.t.
Val87Asn88Thr90	4 <sup>c</sup>	n.t.	1.8
Ser87Asn88Thr90	3 ~ 4 <sup>c</sup>	正常	1.0
Ser87Asn88Gly89Thr90	4	n.t.	n.t.
Ser87Asn88Thr90Thr92	4	減少 <sup>e</sup>	n.t.
Asn89Ile90Thr91	4	n.t.	n.t.
Ser87Asn89Ile90Thr91	4	n.t.	n.t.
Ser87Asn88Thr90Ala162	4	n.t.	1.8
Asn136Thr138	3 ~ 4	n.t.	n.t.
Asn138Thr140	3 ~ 4	n.t.	n.t.
Asn69Thr71Ser87Asn88Thr90	4 ~ 5	n.t.	0.025-0.25
Asn30Thr32Val87Asn88Thr90	4 ~ 5 <sup>c</sup>	正常	1.8
Thr123	3	1 & 2 <sup>f</sup>	n.t.
Thr125	3	1 & 2 <sup>f</sup>	0.7
Pro124Thr125	3	1 & 2 <sup>f</sup>	n.t.
HCG C-末端延長部	3	3. 以上 <sup>g</sup>	1.0-1.3
Ser87Asn88Thr90 HCG 延長部	4	3. 以上 <sup>g</sup>	1.5
Asn30Thr32Val87Asn88Thr90 HCG 延長部	4 ~ 5	3. 以上 <sup>g</sup>	0.8

表 6 の脚注

<sup>a</sup>実施例7Aに記載のようなSDSゲル中の類似体ポリペプチドの移動度に基づいて、

付加的なN-結合鎖の数を推定した。

<sup>b</sup>エリトロポエチン類似体の量に対する類似体のin vivo活性の比。マウス赤血球

増加症のバイオアッセイを用い、CHO細胞上清中の類似体の活性を測定した。CHO

細胞上清中のエリトロポエチン類似体の量を本明細書中に記載のようなRIAまた

はEIAによって測定した。

c 実施例7Aに記載のようなN-グリカナーゼによる部分消化後のSDS-ゲル中の糖タンパク質の泳動を試験することによって付加的炭水化物鎖の数を確認した。

d Ser<sup>126</sup> のO-結合鎖はヒトエリトロポエチン分子の70%に存在する。

e O-グリコシルーションが減少した類似体分子の70%未満はSer<sup>126</sup> に炭水化物鎖を有している。

f 60%を上回るThr<sup>123</sup> EP0分子が2つのO-結合鎖を有している。約40%のThr<sup>125</sup> EP0分子が2つのO-結合鎖を有している。80%を上回るPro<sup>124</sup> Thr<sup>125</sup> EP0分子が2つのO-結合鎖を有している。

g これらの類似体は少なくとも3つのO-結合鎖を有しており、

4個または5個有することもある。HCG単独では4個のO-結合鎖を有することが判っている。

N.T. 試験せず。

表 7

ヒトエリトロポエチン及び炭水化物部位転位を有する類似  
体の活性

<u>EPO配列</u>	<u>N-結合鎖</u>	<u>in vivo活性</u>
		<u>RIAまたはEIA</u>
ヒト	3	0.69
Gln <sup>24</sup>	2	0.16
Gln <sup>38</sup>	2	0.16
Gln <sup>83</sup>	2	0.23
Gln <sup>24</sup> Ser <sup>87</sup> Asn <sup>88</sup> Thr <sup>90</sup> (R1)	3	0.69
Gln <sup>38</sup> Ser <sup>87</sup> Asn <sup>88</sup> Thr <sup>90</sup> (R2)	3	0.41
Gln <sup>83</sup> Ser <sup>87</sup> Asn <sup>88</sup> Thr <sup>90</sup> (R3)	3	0.50
Ser <sup>87</sup> Asn <sup>88</sup> Thr <sup>90</sup>	3~4	1.48

RIAまたはEIAに対するin vivo活性の比は、表6の脚注に記載の手順で測定した。

。

C. エリトロポエチン類似体に由来のイソ形混合物の調製

#### [Thr<sup>125</sup>] EPO (EPO 050)

実施例6の[sectionA]に記載のようにエリトロポエチン類似体 [Thr<sup>125</sup>] EPOを構築した。[Thr<sup>125</sup>] 突然変異を含

むプラスミドpECをBstEII及びBglIIIで開裂し、フラグメントをpDECΔ [pDSα2の誘導体] (実施例6に記載) に結合することによって、[Thr<sup>125</sup>] 突然変異を含む810bpのエリトロポエチンcDNAフラグメントを単離した。

[Thr<sup>125</sup>] エリトロポエチンcDNAを含むプラスミドpDECΔをDHFR欠失CHO細胞にトランスフェクトした。770mlのCHO細胞馴化培地を、カットオフ分子量10,000

ダルトンの膜を用いて濃縮し、10mMのTris-HCl, pH8.6に対し最終容量34mlまで透析濾過した。濃縮物の17mlのアリコートをし、同じ緩衝液で平衡させたQ-セファロースFast Flowカラム（ベッドボリューム5ml）に充填し、10mMのTris-HCl, pH8.6中0-250mMのNaClの直線勾配で溶出させた。カラム分画のアリコートを、非処理でまたはN-グリカナーゼで消化後、SDS-PAGEまたはIEFによって分析し、分画のイソ形及び/または炭水化物組成に基づいてプールを作製した（2、3及び4と命名）。各プールをVydac C4カラム（214TPB 2030；直径1cm；ベッドボリューム1.8~2.5ml；0.34ml/分）に充填し、10mMのTris-HCl, pH7.0中のカラム容量の2倍の20%エタノールで洗浄した。10mMのTris, pH7.0中の20-94%のエタノールの直線勾配でカラムを溶出させた。プールを作製し、10mMのTris-HCl,

pH7.0に希釈し、Q-セファロースFast Flowカラムに充填した。10mMのTris-HCl, pH7.0中で洗浄後、試料を20mMのクエン酸ナトリウム、250mMのNaCl, pH7.0で溶出させた。精製した[Thr<sup>125</sup>] プールをIEFによって分析し図9に示す。更に、上述の方法（Cotesら、前出）でこれらのプールのin vivo生物活性を分析し、結果を表8に示す。

Ser<sup>87</sup> Asn<sup>88</sup> Thr<sup>90</sup> EPO (EPO N14)

#### 調製方法 1

イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー及びゲル濾過クロマトグラフィーから成る3段階手順を用いてEPO N14類似体を精製した。イオン交換段階中に、高レベルのシアル酸を含むイソ形の混合物を与える分画をプールした。逆相クロマトグラフィー中に、類似体を凝集物と共に含むかまたは凝集物を伴わずに含む追加の2つのプールを作製した。精製手順を以下に詳細に説明する。

1. EPO N14類似体を発現するCHO細胞の馴化培地を採集し、YM10膜（Amicon）と共に攪拌槽を用いて約2.5倍に濃縮し、10mMのTris, pH8.5に対し透析濾過した。
2. 濃縮培地を、10mMのTris, pH8.5中で平衡化させたQ-セファロースFF（Pharmacia）カラムに、流速0.2cm/分で、樹

脂 1 mlあたりA<sub>280</sub> が～12となるように充填した。

3. 充填後、カラム容量 (CV) の3倍の10mMのTris, pH8.5でカラムを洗浄し、50 CV中の0-0.5MのNaCl/10mMのTris, pH8.5の勾配で溶出させた。1CVの分画を収集した。

4. 各分画の試料をIEFゲルpH 3～5に添加した。IEF上のイソ形分布に基づいて、主としてイソ形11～18を含む分画プールを作製した。EDTAを最終濃度 1 mMまでプールに添加した。

5. 20%エタノール/10mMのTris, pH7.0中で平衡化させた逆相C4カラム (Vydac) に、イソ形プールを流速2.5cm/分で樹脂 1 mlあたりA<sub>280</sub> が～5となるように充填した。カラムを1 CVの20%エタノール/10mMのTris, pH7.0で洗浄し、30CV中の20-94%エタノール/10mMのTris, pH7.0の勾配で流速 1 cm/分で溶出させた。0.2CVの分画を収集した。

6. 各分画の試料を非還元性12%SDS-PAGEによって分析した。SDSゲル上に観察された凝集物の存在に基づいて個々の2つのプールを作製した。プール# 1はEP0類似体を含んでいたが凝集物を含んでいなかった。プール# 2はEP0類似体と凝集物とを含んでいた。

7. Centricon 10 (Amicon) を用いてプール# 1を約65倍に濃

縮し、プール# 2を約250倍に濃縮した。各プールの緩衝液を20mMのクエン酸ナトリウム/100mMのNaCl, pH7.0に交換した。

8. 20mMのクエン酸ナトリウム/100mMのNaCl, pH7.0中で平衡化させたHPLC BioS<sub>i</sub>l SEC-250 (BioRad) カラムで各プールを個別に精製した。プールを流速2.26cm/分で樹脂 1 mlあたりA<sub>280</sub> が< 6となるように充填した。類似体モノマーに対応するピークを各処理試料から収集した。

9. 各プールの吸光度を測定し、各プールの一部分を濃縮してSDS-PAGE及びIEFゲルで分析した。プール# 1はイソ形15-17の分布を有しており、このプールを薬物動態試験及び受容体結合試験に使用した。

## 調製方法 2

イオン交換クロマトグラフィー、逆相HPLC及びヒドロキシルアパタイトクロマ

トグラフィーから成る3段階手順を用いてEPO N14類似体を精製した。イオン交換段階中に、類似体を、異なるイソ形混合物を含む3つのプールに分割した。精製手順を以下に詳細に説明する。

1. EPO N14を発現するCHO細胞の上清を採集し、FiltronMini-Ultrasette正接流デバイスを用いて約10倍に濃縮し、

10mMのTris, pH8.5に対し透析濾過した。

2. 10mMのTris, pH8.5中に平衡化させたQ-セファロース FF (Pharmacia) カラムに濃縮培地を流速0.2cm/分で樹脂1mlあたりA<sub>280</sub> が~10となるように充填した。

3. 充填後、カラム容量 (CV) の3倍の10mMのTris, pH8.5でカラムを洗浄し、50CV中の0-0.5MのNaCl/10mMのTris, pH8.5の勾配で溶出させた。1CVの分画を収集した。

4. 各分画の試料をIEFゲル, pH 3~5で泳動した。IEFによって測定したイソ形分布に基づいて個々の3つの分画プールを調製した。低イソ形プール (イソ形4~12)、中イソ形プール (イソ形5~15) 及び高イソ形プール (イソ形6~18) を作製した。

5. 各イソ形プールをVydac C4逆相HPLCカラムで個別に精製した。アセトニトリルが毎分1%の割合で増加する0.1%TFA/H<sub>2</sub>Oから0.1%TFA/75%アセトニトリルまでの勾配でカラムを展開させた。

6. 各プールから類似体のピークを収集し、4倍容の80mMのTris-HCl/20mMのTris塩基で希釈し、次いで濃縮し、溶媒耐性Centricon 3を用いて緩衝液を10mMのTris, pH7.2に交換した。

7. 各試料を1mlあたりのA<sub>280</sub> が2になるまで10mMのTris, pH7.2で希釈し、等量の4MグアニジンHCl (GuHCl)、10mMのCHAPS、10mMのTris, pH7.2を添加して、試料の最終濃度を1mlあたりのA<sub>280</sub> が1になるようにした。各試料を2MのGuHCl、5mMのCHAPS、10mMのTris, pH7.2で平衡化させたヒドロキシルアパタイトミニカラムに充填した。平衡緩衝液でカラムを洗浄し、1CVの素通り分画を収集した。

8. 分画の吸光度を測定し、プールを作製し、Centricon10を用いて緩衝液を10mMのTris, pH7.2に交換した。各プールの吸光度を測定した。

最終プールをSDS-PAGE及びIEFゲルで分析した。IEFゲルを図12に示す。RIA及びin vivo活性アッセイを実施例7Aに記載の手順で行った。最終イソ形プールのin vivo活性を表8に示す。マウスのヘマトクリット増加を測定する試験に高シアル酸イソ形プールを使用した。

表 8

## エリトロポエチン類似体のイソ形の活性

EPO配列	イソ形プール	in vivo活性
		<u>u/mgペプチド<sup>a</sup></u>
Thr <sup>125</sup>	イソ形8-12	147,000 <sup>b</sup>
	イソ形9-15	215,000 <sup>b</sup>
	イソ形13-15	111,000 <sup>b</sup>
Ser <sup>87</sup> Asn <sup>88</sup> Thr <sup>90</sup>	イソ形7-12	132,000±17,000
	イソ形10-14	233,000±39,000
	イソ形12-17	272,000±14,000

<sup>a</sup>エリトロポエチンペプチドのミリグラム数をSer<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>EPOイソ形プールのA<sub>280</sub>から、溶液1mlあたり1mgの場合の吸光係数0.93を用いて算出した。

<sup>b</sup>Thr<sup>125</sup>EPOイソ形プールについては、実施した活性アッセイが1回または2回だったので標準偏差を記録していない。

## 実施例8：EPO N14類似体の生物学的特性

EPO N14類似体のイソ形プール、組換えヒトエリトロポエチン (rHuEPO) 及び

単離rHuEPOイソ形14の活性を、i.v.薬物動態アッセイ、受容体結合アッセイ及びヘマトクリット

試験で比較した。EPO N14イソ形プールは、実施例7Cに記載の手順で調製した。rHuEPOは、Laiら、前出、に従って調製した。rHuEPOイソ形14は、以下の手順で調製した。イソ形10、11、12、13、14及び15の混合物から成るrHuEPOを、10mMのTris, pH7.2中で平衡化させたQ-セファロースFast Flowカラム（寸法＝直径2.2cm×高さ3.4cm）に充填した。充填カラムを2mMの酢酸/6Mの尿素（緩衝液「A」）に平衡化させ、イソ形13及び14の精製を最適にするように設計された多相勾配を実施した。勾配は、750ml中0%-7.3%の800mM酢酸/6M尿素（緩衝液「B」）、750ml中7.3%-11.4%の緩衝液B、1250ml中11.4%-26.8%の緩衝液B、1250ml中26.8%-62.4%の緩衝液B、次いで700ml中62.4%-100%の緩衝液Bであった。12.5mlの分画を収集し、アンモニア水で中和し、次いでポリアクリルアミドゲル中の等電点電気泳動によって検定した。純粋なイソ形14を含む分画と一緒にプールし、YM-10膜を備えたAmicon撹拌槽で濃縮し、緩衝液を水に交換した。

#### A. i.v.薬物動態

EPO N14類似体（イソ形15～17）及び単離イソ形14の薬物動態パラメーターをrHuEPOのものと比較するために個々の2つの試験を実施した。

各試験で、 $1\mu\text{Ci}$ の $^{125}\text{I}$ -単離イソ形14、 $^{125}\text{I}$ -EPO N14類似体または $^{125}\text{I}$ -組換えヒトエリトロポエチン（Amersham）を、頸動脈カニューレによって体重310～378gの雄スプレーグ・ドローラットに静注した。投与後の種々の時点に、0.3mlの血液を採取し、遠心によって血清を調製した。0.1mlの各血清試料中の $^{125}\text{I}$ -EPO（組換えヒト、単離イソ形14またはEPO N14類似体）濃度を、90%エタノールと共に4℃で一晩インキュベーション後に測定した。各血清試料中のエタノール沈殿した $^{125}\text{I}$ -EPOをガンマカウンタでカウントし、得られた薬物動態グラフを図13に示す。PCNONLIN 4.0非線形回帰分析（Statistical Consultants, 1992）を用いて各ラットの薬物動態パラメーターを測定し、各グループの結果を平均化した。EPO N14類似体及び単離イソ形14の薬物動態試験の結果を表9にまとめる。



表 9 に示すように、EPO N14類似体の血清クリアランスは組換えヒトエритроポエチンの計算値に比較して有意な差を示す。組換えヒトエритроポエチンは、単離イソ形14の3.97時間及びEPO N14類似体の4.36時間に比べて3.10時間という最も速いベータ半減期を示した。組換えヒトエритроポエチングループはまた、単離イソ形14の2.40時間及

びEPO N14類似体の3.03時間に比べて1.78時間という最速のクリアランス半減期を有していた。

表 9

3 i. v. 投与後の rHuEP0、rHuEP0イソ形14及びEP0 N14(イソ形15-17)の薬物動態パラメーターの要約

調製物	半減期 (hours)	AUC (cpm-hr/ml)	VD (ml/Kg)	除去 速度定数 (Hr <sup>-1</sup> )	クリアランス (ml/Kg-hr)	クリアランス 半減期 (Hours)
rHuEP0	平均 0.332	3.10	308901	44.9	0.400	6.14
n=6	標準偏差 0.155	0.54	69187	8.3	0.069	1.36
イソ形14	平均 0.388	3.97	483329	36.5	0.288	3.80
n=4	標準偏差 0.066	0.40	55638	2.2	0.020	0.12
EP0 N14	平均 0.422	4.36	692231	37.4	0.230	2.67
n=4	標準偏差 0.165	0.36	40355	1.9	0.021	0.17

\* 薬物動態試験したEP0 N14の組換えヒトエリトロポエチングループ(n=4)と薬物動態試験した単離イソ形14の組換えヒトエリトロポエチングループ(n=2)との平均

#### B. 受容体結合アッセイ

EP0 N14類似体(イソ形15~17)とエリトロポエチン受容体との相互作用を、ヒト赤白血球OCIMI細胞(Papayannopoulouら、Blood 64 (supp.1), 116a (1984))を用いた低温置換アッセイで試験した。受容体との結合において<sup>125</sup>I-rHuEP

0と競合するEPO N14の必要量を決定するために、漸増濃度の非標識EPO N14を一定濃度の $^{125}$  I-rHuEPOと共にOCIM1細胞とインキュベートした。比較として、漸増濃度の非標識rHuEPOも一定濃度の $^{125}$  I-rHuEPOと競合させた。

非標識EPO N14をアッセイ緩衝液に希釈し、0.03ng、0.1ng、0.3ng、1.0ng、3.0ng、10.0ng及び30.0ng（ペプチド質量に基づく）の量で添加した。全部のアッセイ管に、0.5ngの $^{125}$  I-組換えヒトEPOを添加し、次いで約 $0.5 \times 10^6$ のOCIM1細胞を添加した。アッセイ管を次に、振盪水浴中で37℃で2時間インキュベートした。インキュベーション後、OCIM1細胞に結合した $^{125}$  I-rHuEPOから未結合の $^{125}$  I-rHuEPOを分離するために、溶液をジブチルフタレート／ビーフタレート油溶液中で遠心した。細胞ペレットを単離し、細胞に結合した $^{125}$  I-rHuEPOをガンマカウンティングによって測定した。細胞に特異的に結合したカウント数を計算し、競合物

質の非存在下で $^{125}$  I-rHuEPOの50%結合に競合するために必要な非標識タンパク質の濃度を線形回帰分析によって決定した。

3つのアッセイの結果は、OCIM1細胞への $^{125}$  I-rHuEPOの結合を50%減少させるために平均 $2.67 \pm 0.73$ ngの非標識EPO N14ペプチドが必要であることを示した。同じ3つのアッセイにおいて、0.5ngの $^{125}$  I-rHuEPOの結合と競合するために必要な非標識rHuEPOは平均 $0.51 \pm 0.15$ ngであった。これらの結果に基づくと、EPO受容体への結合において $^{125}$  I-rHuEPOと競合するためには、非標識r-HuEPO ( $p < 0.01$ ) の5.25倍のEPO N14が必要であった。

エリトロポエチン受容体との結合に関してEPO N14類似体、単離イソ形14及び組換えエリトロポエチンを直接比較するために追加実験を実施した。この実験の結果は、EPON14類似体が受容体に対して単離イソ形14よりも低い親和性を有していることを示した。受容体との結合において $^{125}$  I-rHuEPOと競合するためには、非標識イソ形14の約2倍過剰のEPO N14類似体が必要であった（図14）。

### C. ヘマトクリット試験

（実施例7Cに記載の調製物2から得られた）EPO N14の高イ

ソ形プール及び低イソ形プール、単離イソ形14並びに組換えヒトEPOの処置マウスヘマトクリット増加能力を比較するためにin vivo試験を実施した。この試験で使用したEPO N14の高イソ形プール及び低イソ形プールのイソ形分布を図12に示す。

CD1マウス（約30g）に、0.25%マウス血清アルブミン中で調製された上記調製物の1つ、またはブラシーボ（0.25%マウス血清アルブミンを含むPBS）を毎週3回ずつ合計6週間腹腔内注射した。ペプチド質量に基づくエリトロポエチン調製物の投与量は、30gのマウスがEPO N14の高プール、EPON14の低プール、イソ形14及びr-HuEPO標準の各々を投与あたり0.071  $\mu$ g受容する量とした。EPO N14の高プール及びイソ形14の場合には、ペプチド投与量を投与あたり0.036  $\mu$ gとした追加グループも試験した。眼窩後方から採血することによって全部のマウスのヘマトクリットの基線量を測定しその後毎週2回測定した。実験の終了後、全部の動物から血清を収集し、注射物質に対する抗体を検定した。抗体中和が陰性であると判定された動物で得られたデータを以後の分析に使用した。

図15に示すように、EPO N14の高イソ形プールで処理し

た動物は、他の調製物に比較して最高の群平均ヘマトクリットに達した。イソ形14、組換えヒトEPO及びEPO N14の低イソ形プールではヘマトクリットが増加していたが増加の程度はもっと低かった。

種々のエリトロポエチン調製物をより定量的に比較するために、ヘマトクリット増加の平均初期速度（0～11日）、グラフ下方の面積（0～39日）及び総ヘマトクリット増加を計算した（表10）。これらの判定基準のいずれによっても、EPO N14の高イソ形プールは、試験した他の調製物のどれよりもペプチドの基準質量で活性であると考えられる。EPO N14の高イソ形プール及びイソ形14は組換えヒトEPOよりも活性であった。EPO N14の低プールはどの分析物と比較したときにも最低の活性を有していた。

表 10

マウスのヘマトクリットに対するEP0 N14(高及び低イソ形プール)、イソ形14及びrHuEPO

の効果

調製物	投与量(μg)	Hct増加速度 <sup>1</sup> (points/day)	グラフ下面積 <sup>2</sup>	総Hct増加 <sup>3</sup> (Hct points)
N14 高プール	0.071	1.46	619	25.4
イソ形14	0.071	1.19	546	22.6
N14 高プール	0.036	0.98	428	19.1
イソ形14	0.036	0.76	284	10.7
r-HuEPO	0.071	1.0	424	17.5
N14 低プール	0.071	0.5	212	9.3

<sup>1</sup>ヘマトクリット増加の初期速度は0-11日から線形回帰によって算出した。<sup>2</sup>グラフ下面積は0-39日から台形加算によって算出した。<sup>3</sup>総ヘマトクリット増加は39日目のグループ平均ヘマトクリットから基線量のグループ平均ヘマトクリットを減算することによって算出した。

本発明を好ましい実施態様に基づいて説明してきたが、本発明は、開示された実施態様に限定されることなく、逆に、請求の範囲の思想及び範囲に包含される種々の修正及び均等を包含する。請求の範囲は、かかる修正及び均等をすべて包含する最も広い範囲に解釈されるべきである。

配列表

SEQ ID NO (配列番号) : 1 :

配列特性 :

- (A) 長さ : 30塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

配列

CGCCCACCAA ACCTCAGCTG TGACAGCCGA 30

SEQ ID NO : 2 :

配列特性 :

- (A) 長さ : 27塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

配列

ATCTGTACAA CCGAAGCCTG GAGAGGT 27

SEQ ID NO : 3 :

配列特性 :

- (A) 長さ : 23塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

配列

GGGCCTGGCC AACCTGTCGG AAG 23

SEQ ID NO : 4 :

配列特性 :

(A) 長さ : 26塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

配列

TCCCCTCCAG ATAATGCCTC AGCTGC

26

SEQ ID NO : 5 :

配列特性 :

(A) 長さ : 24塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

配列

CAGATGCGAA CTCATCTGCT CCAC

24

SEQ ID NO : 6 :

配列特性 :

(A) 長さ : 33塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

配列

AGGCCTGCAG GAATGGGAGC AGATGACCAG GTG

33

SEQ ID NO : 7 :

## 配列特性：

- (A) 長さ：23塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

TCCAGATGCG ACCTCAGCTG CTC

23

SEQ ID NO：8：

## 配列特性：

- (A) 長さ：23塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

CCTCCAGATC CGACCTCAGC TGC

23

SEQ ID NO：9：

## 配列特性：

- (A) 長さ：28塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

GGGCCTGGCC AACCTGACAG AAGCTGTC

28

SEQ ID NO：10：

## 配列特性：



(A) 長さ：30塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

CAGGGCCTGT CCAACCTGAC AGAAGCTGTC 30

SEQ ID NO : 11 :

配列特性：

(A) 長さ：24塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

CAGATGCGAA CTCAACGGCT CCAC 24

SEQ ID NO : 12 :

配列特性：

(A) 長さ：35塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

ATGCGAACTC AACGGCTCCA CTCACAACAA TCACT 35

SEQ ID NO : 13 :

配列特性：

(A) 長さ：27塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

CCAGATCCAA ATTCACTCTGC TCCACTC

27

SEQ ID NO.: 14 :

配列特性：

(A) 長さ：27塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

CCAGATCCAA ATTCAACAGC TCCACTC

27

SEQ ID NO.: 15 :

配列特性：

(A) 長さ：24塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

CCAGATGCGA CAACAGCTGC TCCA

24

SEQ ID NO.: 16 :

配列特性：

(A) 長さ：23塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

AGATCCGACC ACCGCTGCTC CAC

23

SEQ ID NO : 17 :

配列特性：

(A) 長さ：23塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

TGCTCCACTC ACAACAATCA CTG

23

SEQ ID NO : 18 :

配列特性：

(A) 長さ：184塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

TCGAGGAACT GAAAAACCAG AAAGTAACT GGTAAGTTTA GTCTTTTGT CTTTATTTC 60

AGGTCCCGGA TCCGGTGGTG GTGCAATCA AAGAACTGCT CCTCAGTGGA TGTGCTTTT 120

ACTTCTAGGC CTGTACGGAA GTGTTACTTC TGCTCTAAAA GCTGCTGCAA CAAGCTGGTC 180

GACC 184

SEQ ID NO : 19 :

## 配列特性：

- (A) 長さ：107塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎖の数：二本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

## 配列

```
CCTGTAGGAC AGGGGACAGA TCCTCTTCCT CAAAGGCCCC TCCCCCAGC CTTCCAAGTC 60
CATCCCGACT CCCGGGGCCC TCGGACACCC CGATCCTCCC ACAATGA 107
```

SEQ ID NO : 20 :

## 配列特性：

- (A) 長さ：108塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎖の数：二本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

## 配列

```
GATCTCATTG TGGGAGGATC GGGGTGTCCG AGGGCCCCGG GAGTCGGGAT GGACTTGGA 60
GGCTGGGGGG AGGGGCCGAG GAAGAGGATC TGTCCCCTGT CCTACAGG 108
```

SEQ ID NO : 21 :

## 配列特性：

- (A) 長さ：23塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

GGAGGCCGAG CAGATCACGA CGG

23

SEQ ID NO : 22 :

配列特性 :

- (A) 長さ : 23塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

配列

CTTGAATGAG CAGATCACTG TCC

23

SEQ ID NO : 23 :

配列特性 :

- (A) 長さ : 21塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

配列

CTGTTGGTCC AGTCTTCCCA G

21

SEQ ID NO : 24 :

配列特性 :

- (A) 長さ : 23塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

配列

CCTGTTGGTC CAGTCTTCCC AGC

23

SEQ ID NO : 25 :

配列特性 :

- (A) 長さ : 28アミノ酸
- (B) 型 : アミノ酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列

Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg

1 5 10 15

Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln

20 25

SEQ ID NO : 26 :

配列特性 :

- (A) 長さ : 193アミノ酸
- (B) 型 : アミノ酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

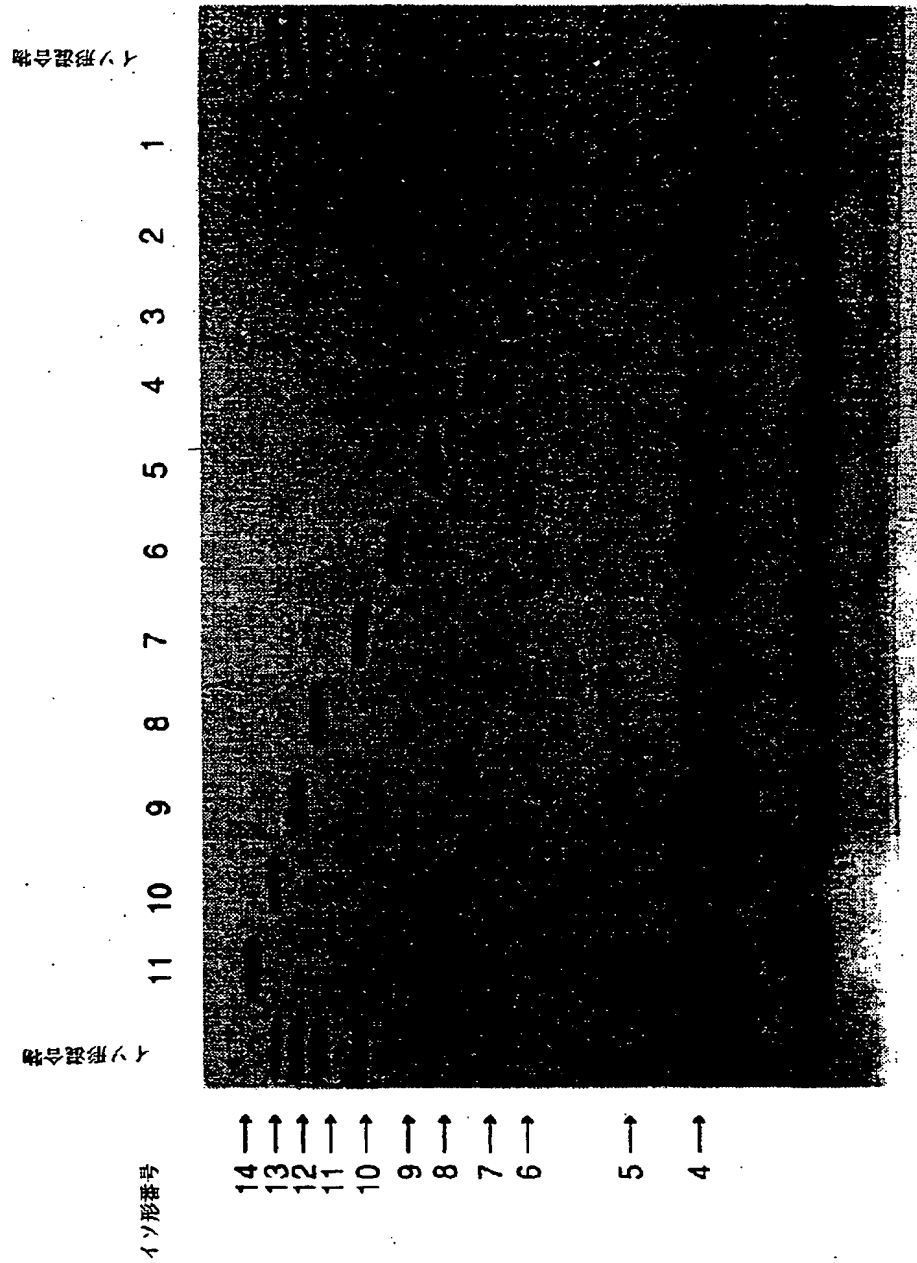
配列の種類 : タンパク質

配列

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu  
 20 25 30  
 Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu  
 35 40 45  
 Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu  
 50 55 60  
 Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg  
 65 70 75 80  
 Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu  
 85 90 95  
 Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser  
 100 105 110  
 Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly  
 115 120 125  
 Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu  
 130 135 140  
 Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile  
 145 150 155 160  
 Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu  
 165 170 175  
 Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp  
 180 185 190  
 Arg

【図1】

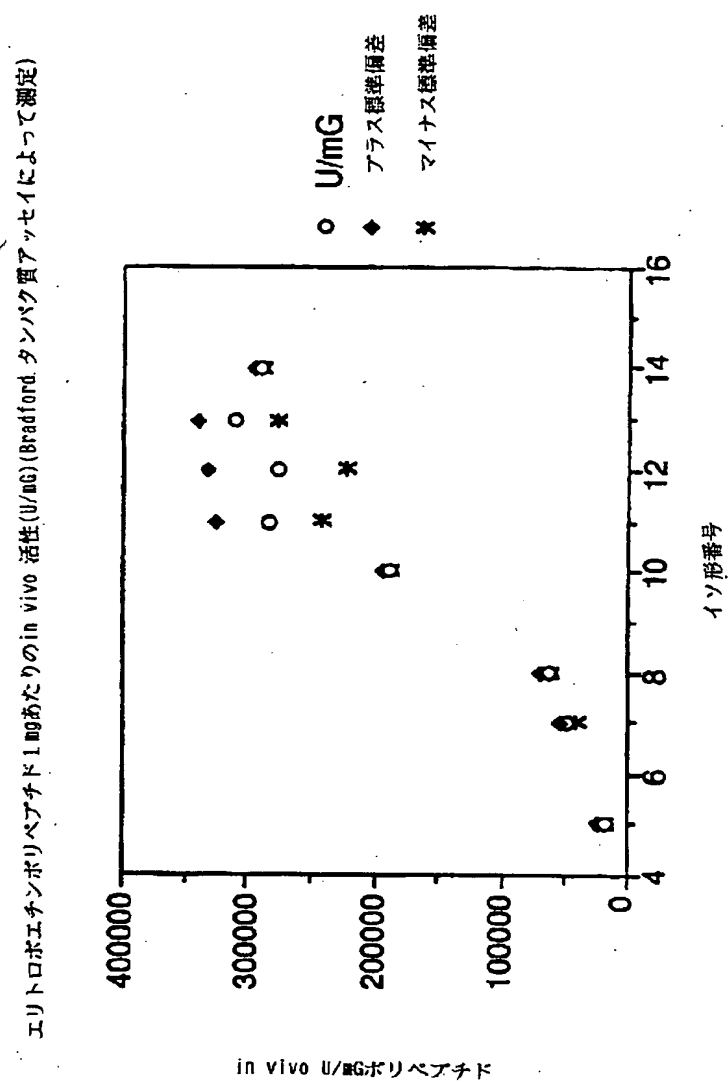
FIG.1





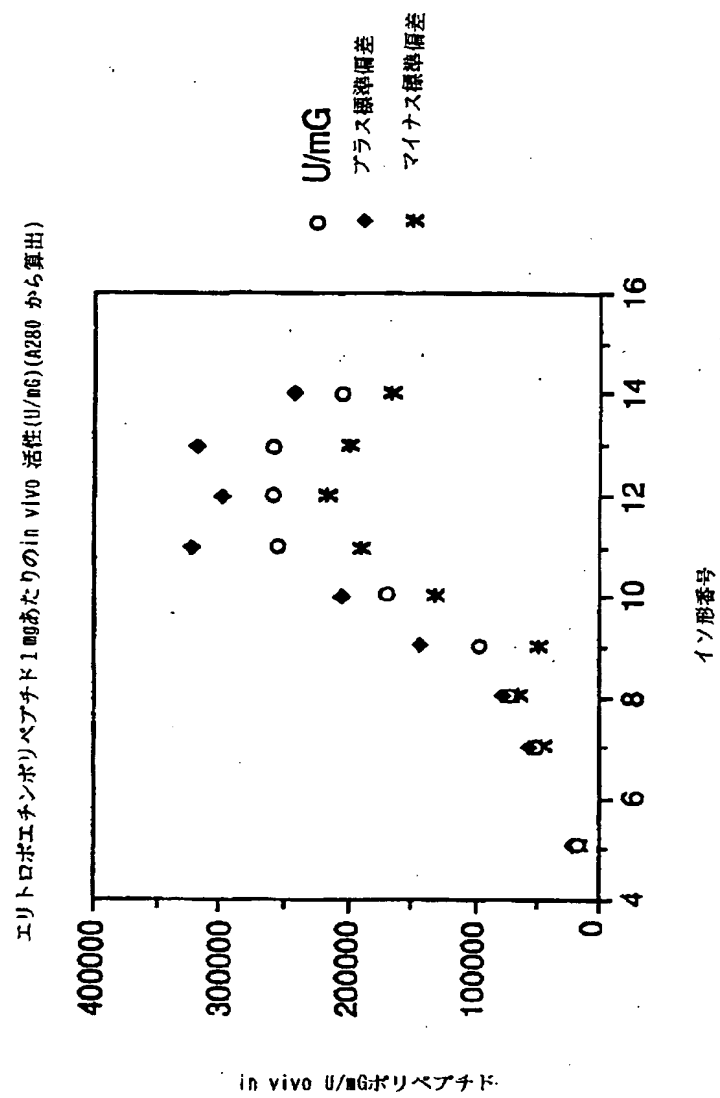
【図2A】

FIG. 2A



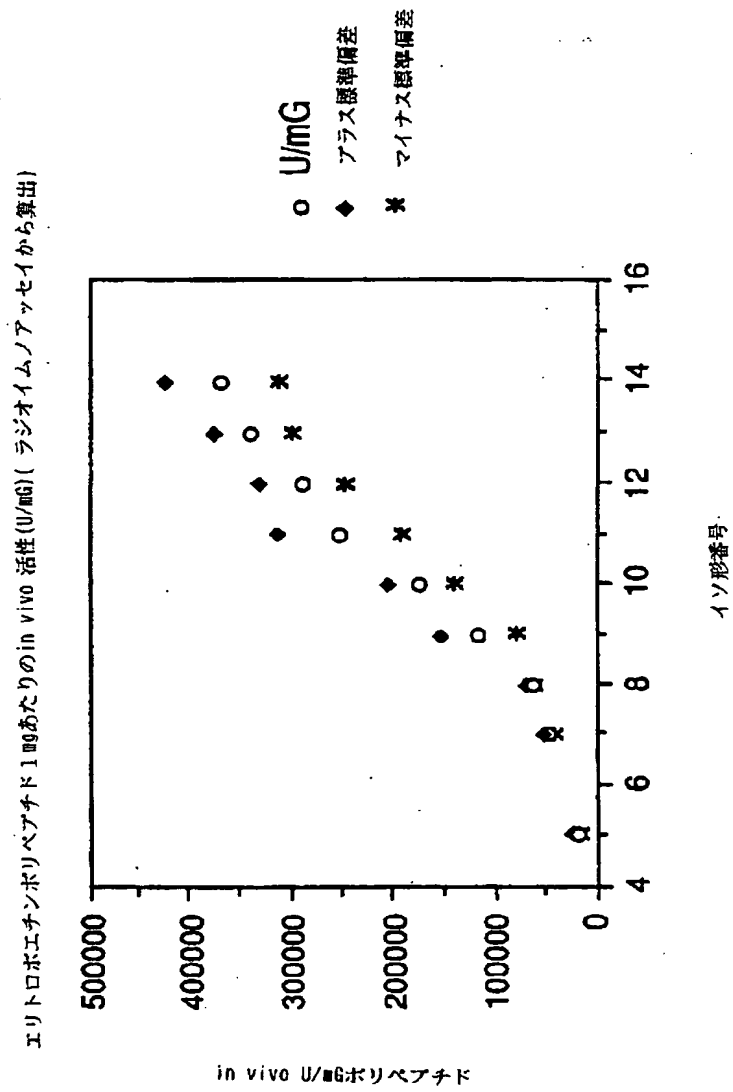
【図2B】

FIG. 2B



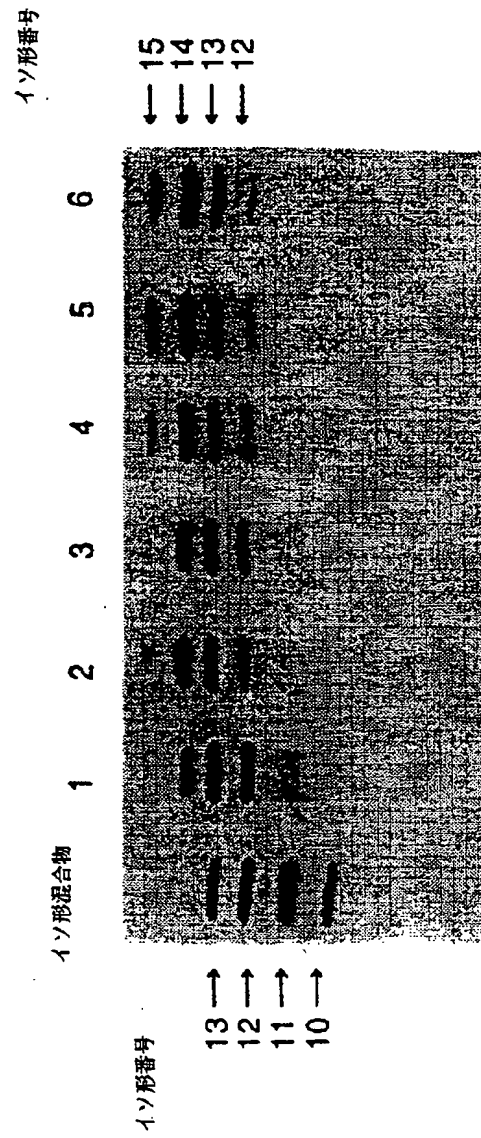
【図2C】

FIG. 2C



【図3】

FIG. 3



【図4】

FIG. 4

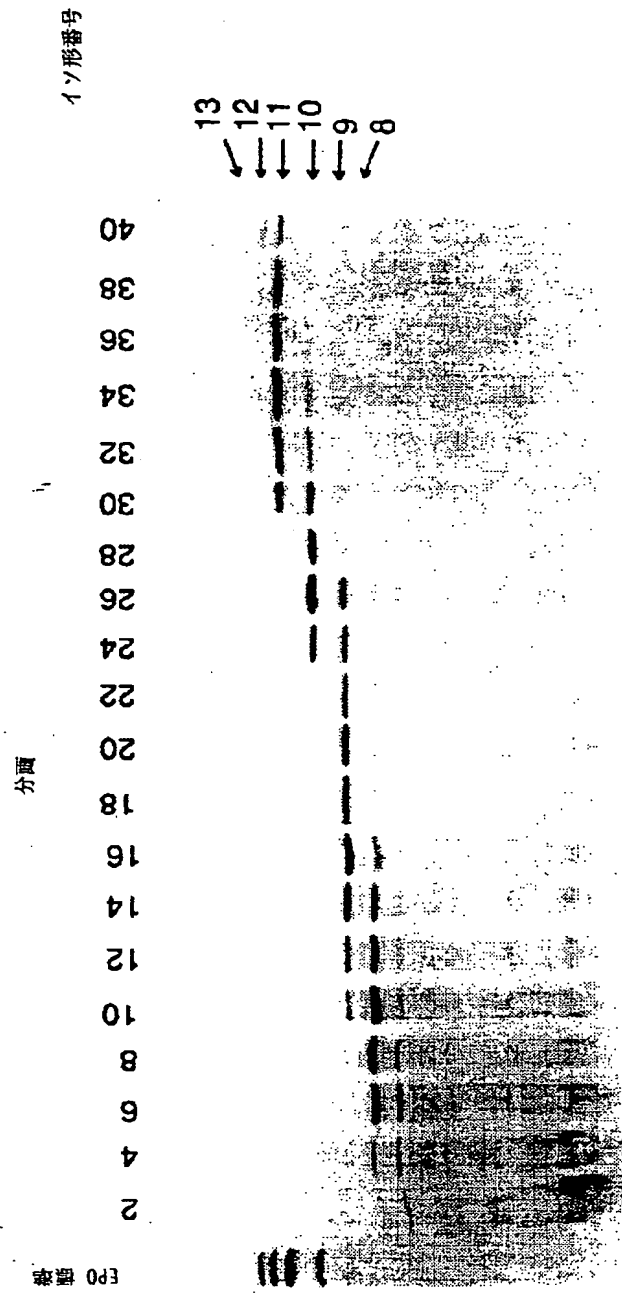
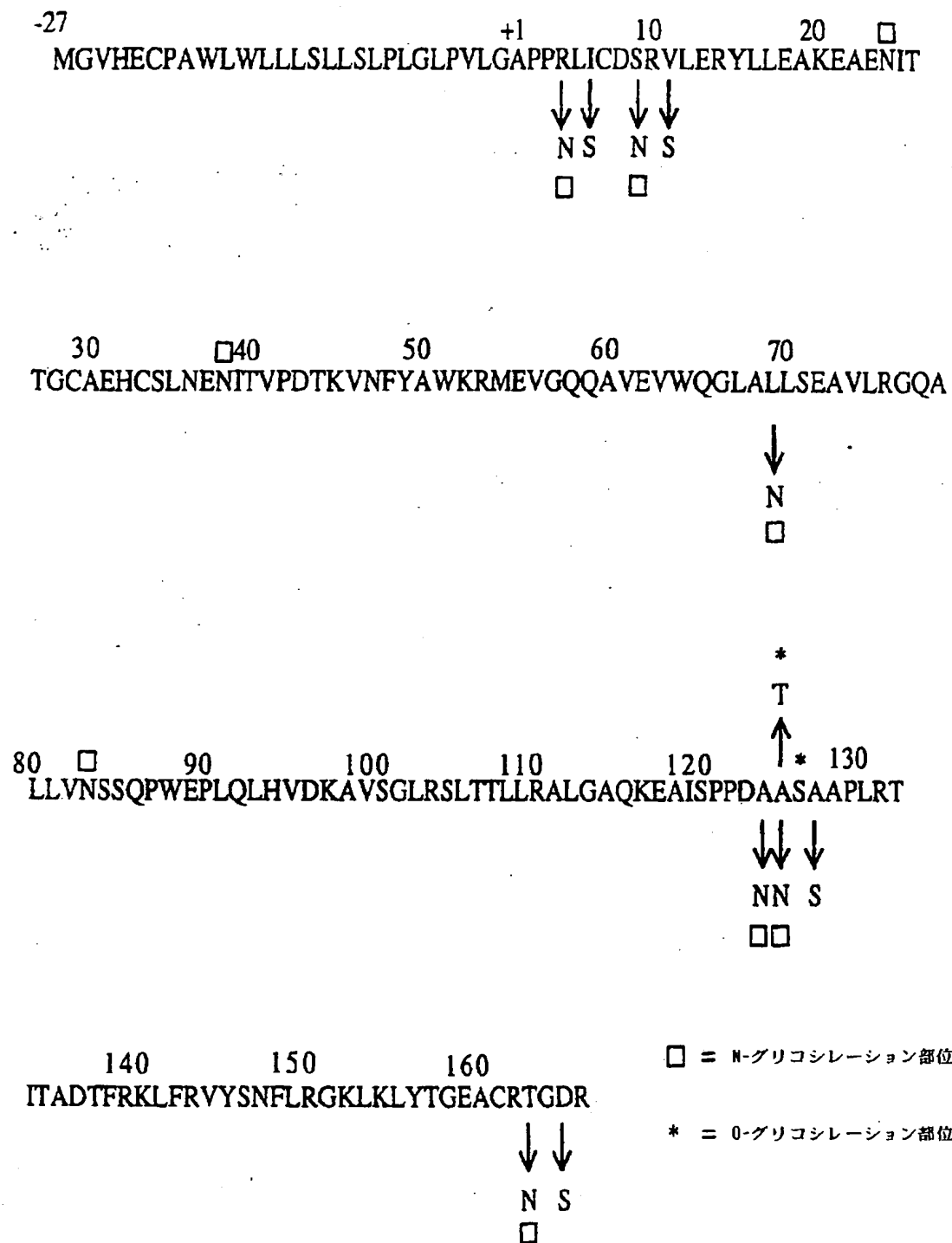
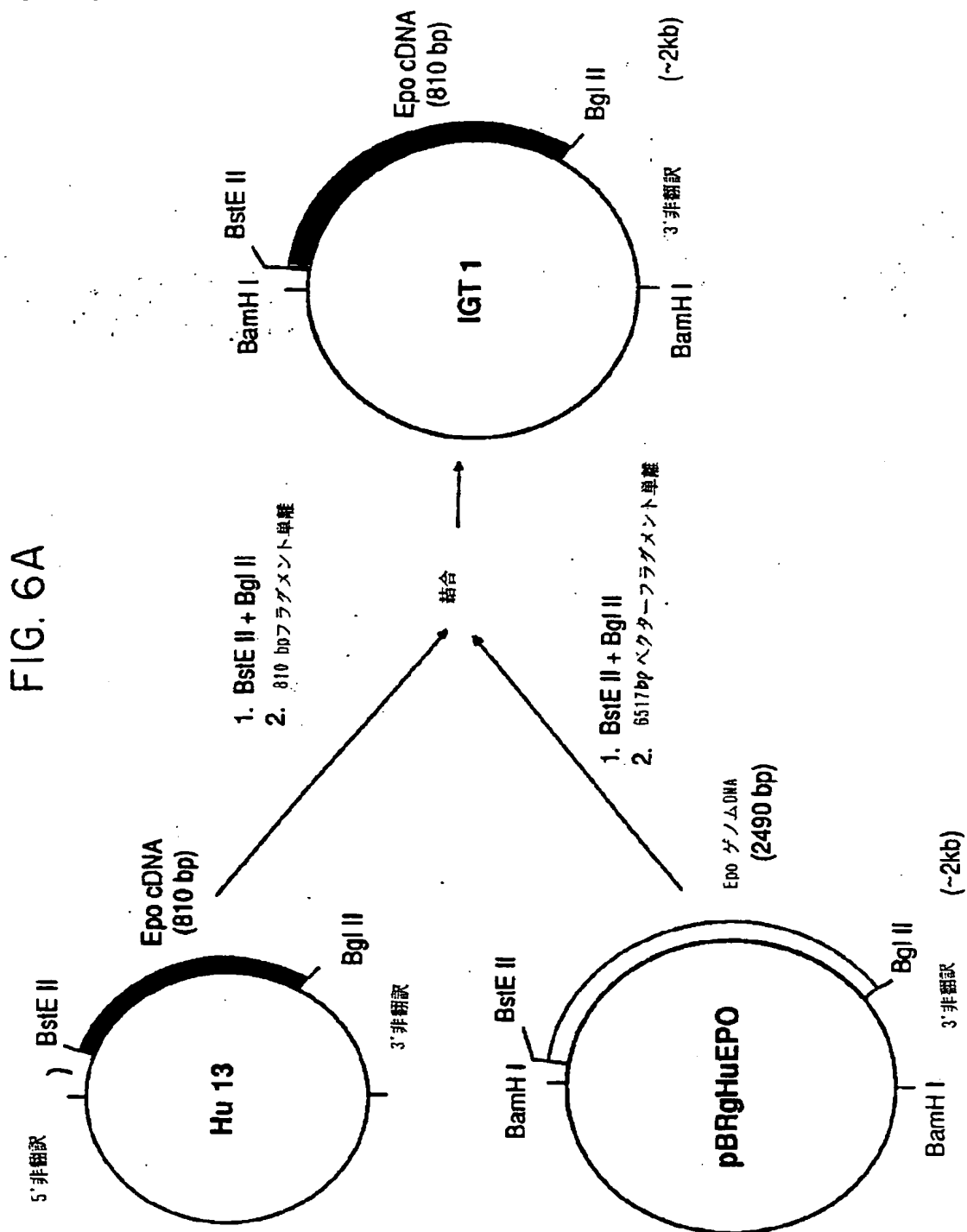


FIG. 5

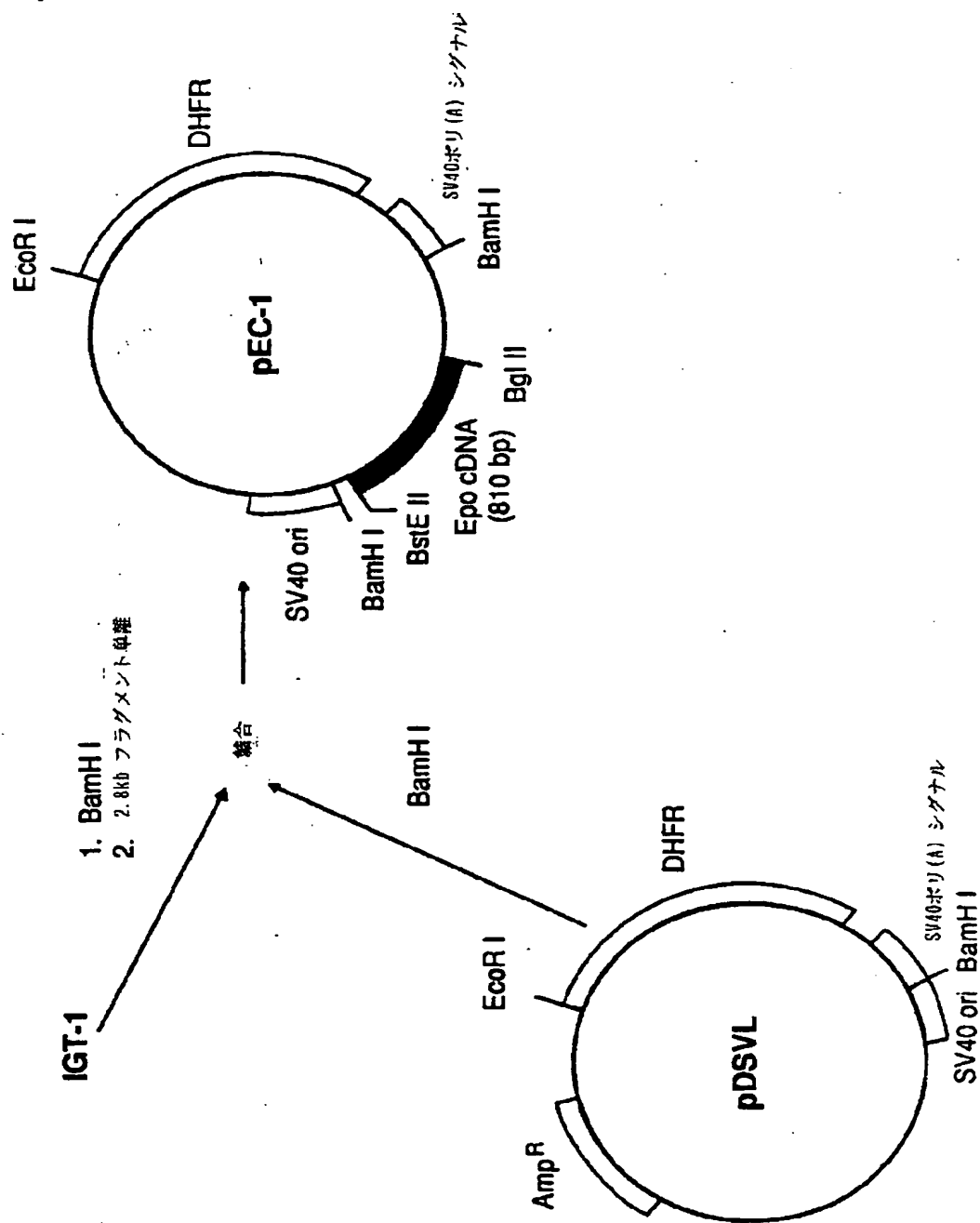


【図6A】



【図6B】

FIG. 6B





【図6C】

FIG. 6C

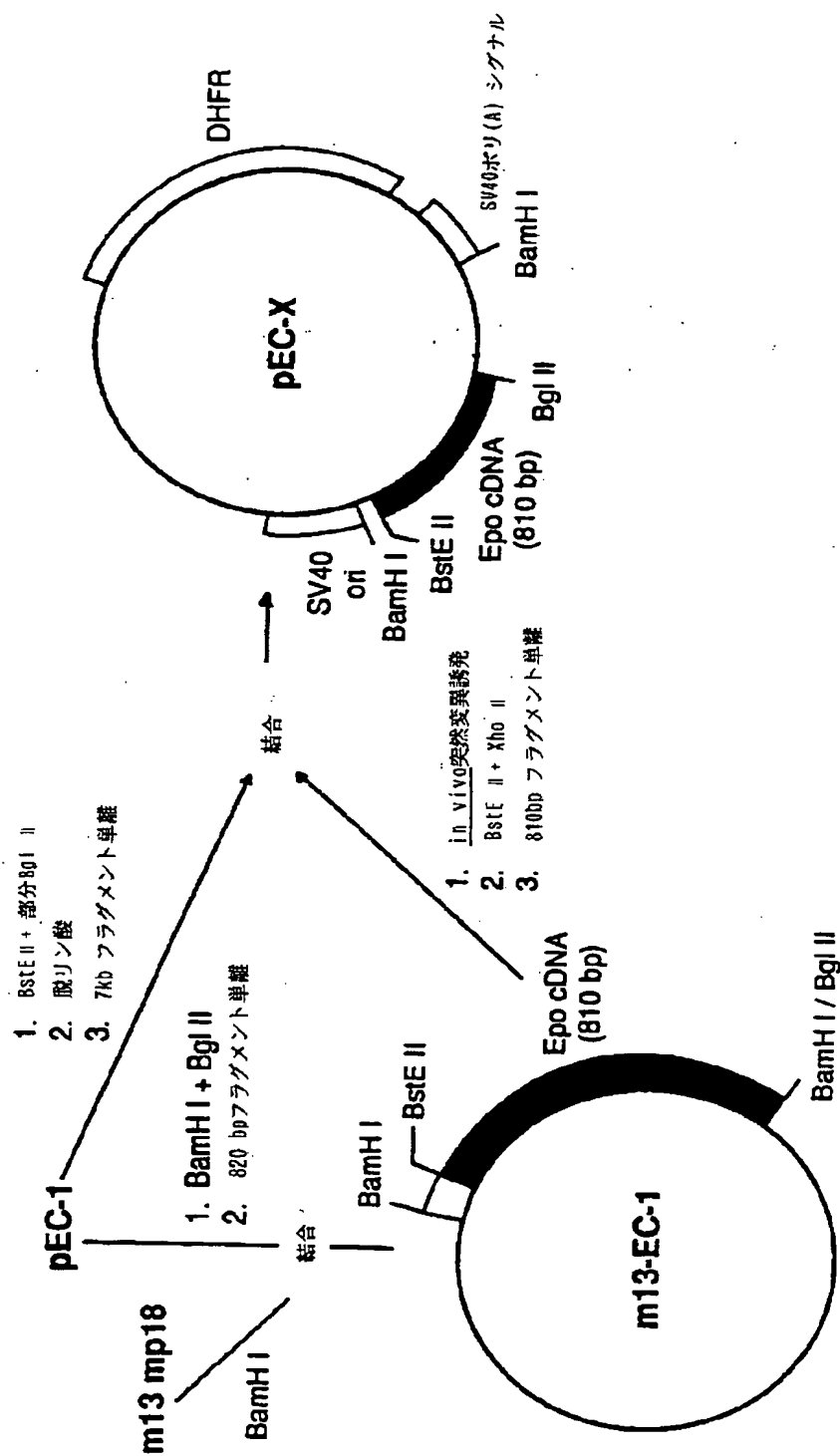
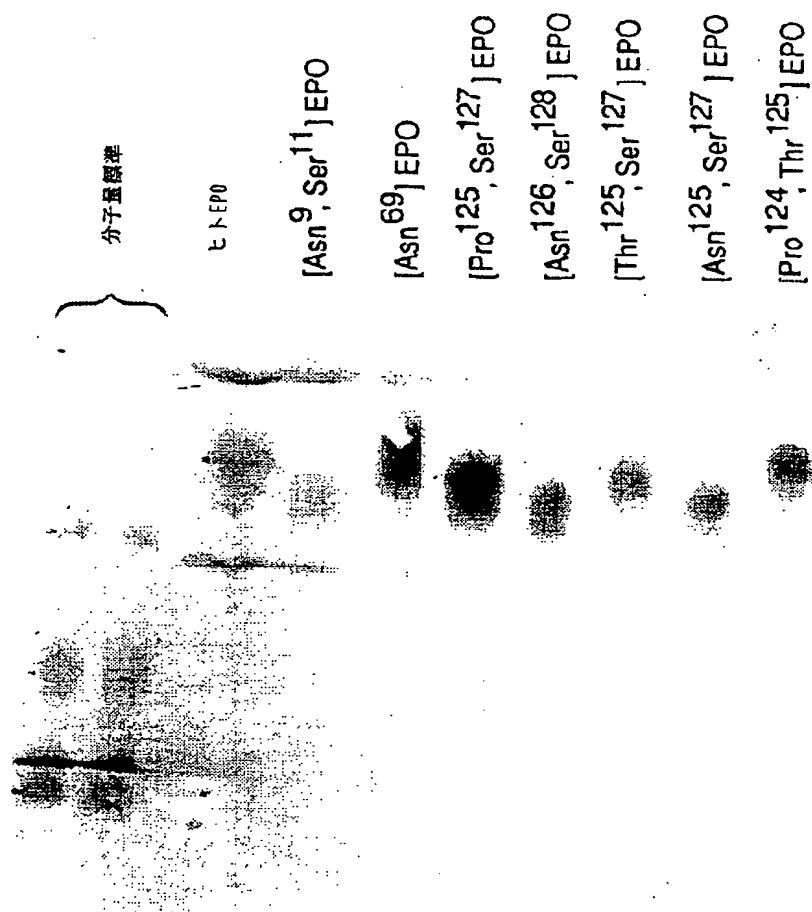
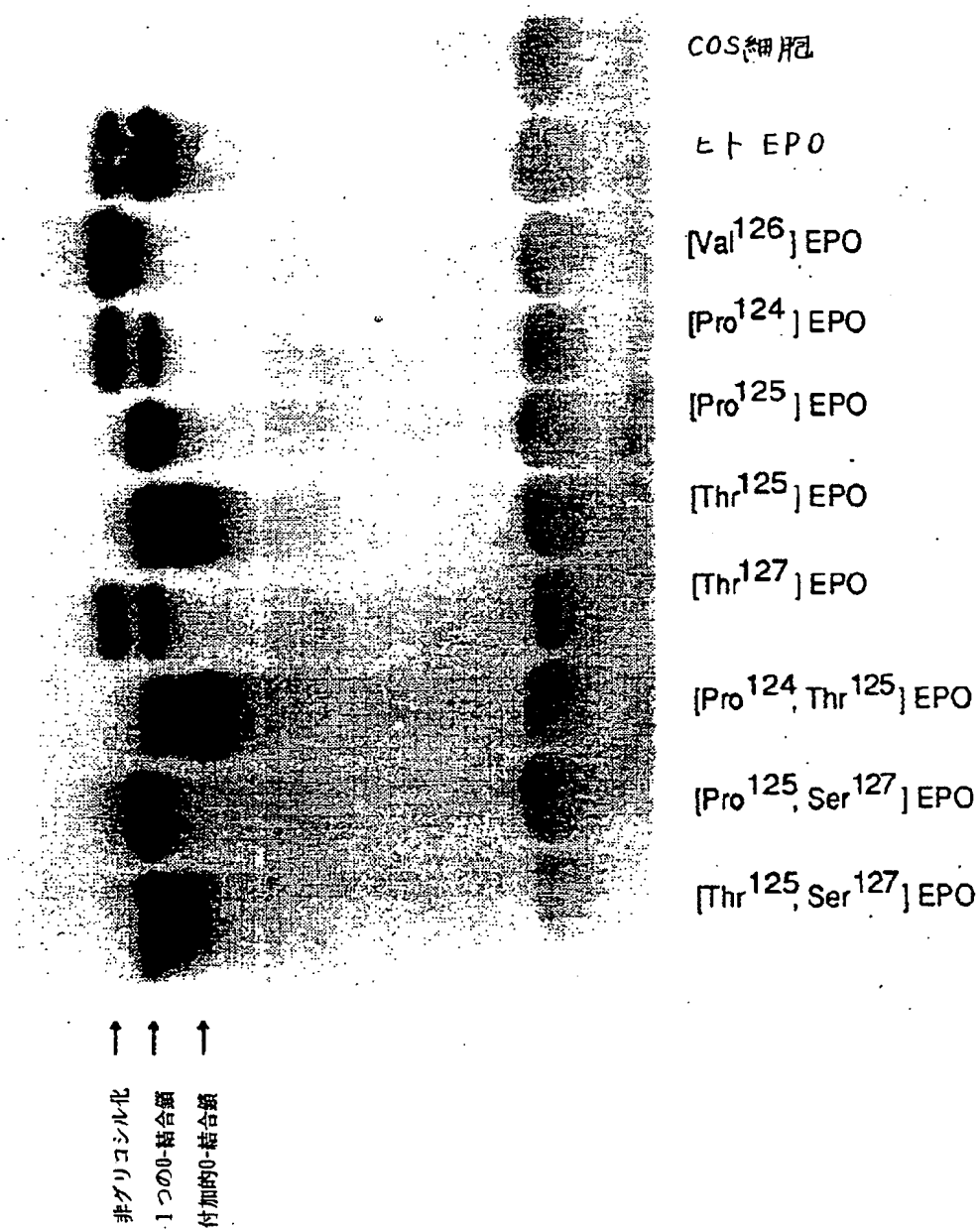


FIG. 7



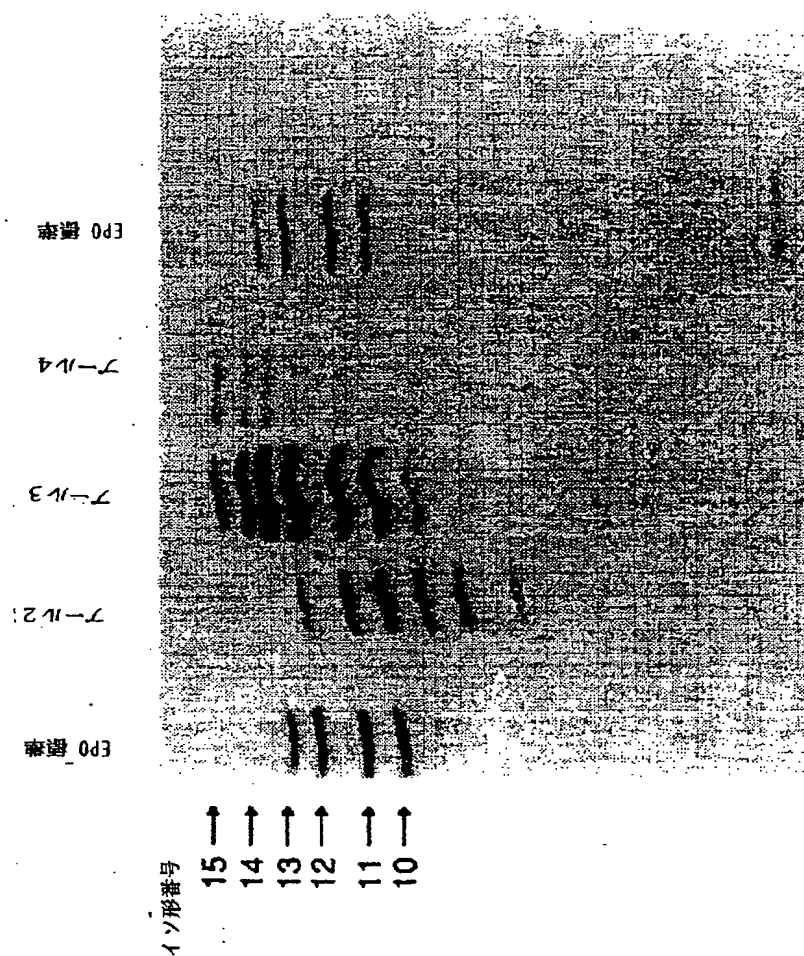
【図8】

FIG. 8



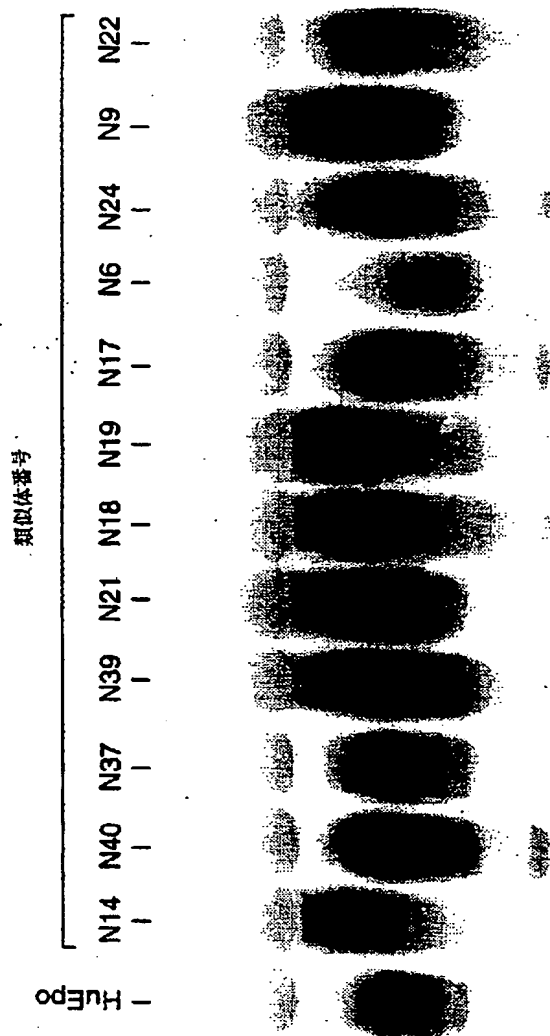
【図9】

FIG. 9



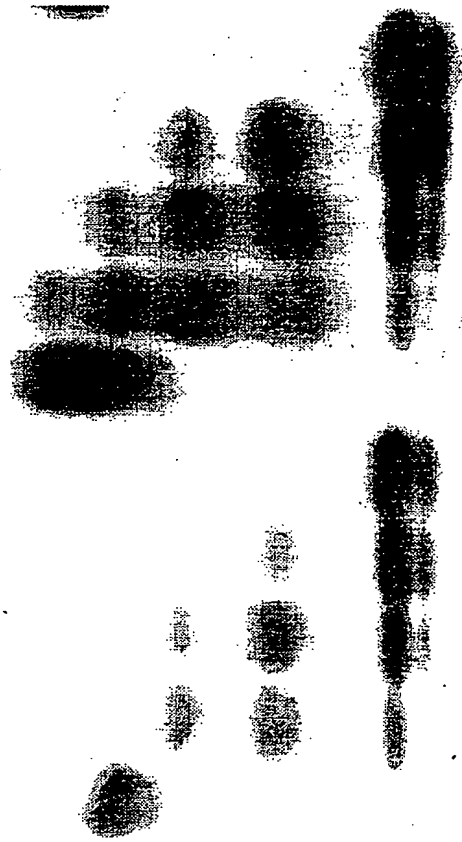
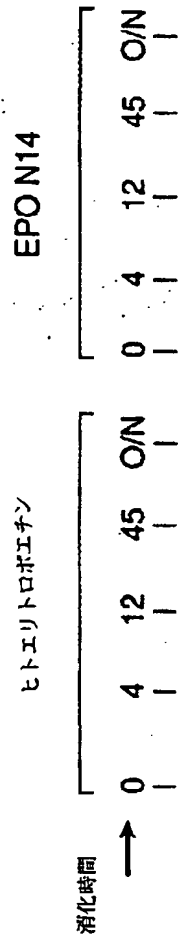
【図 10】

FIG. 10



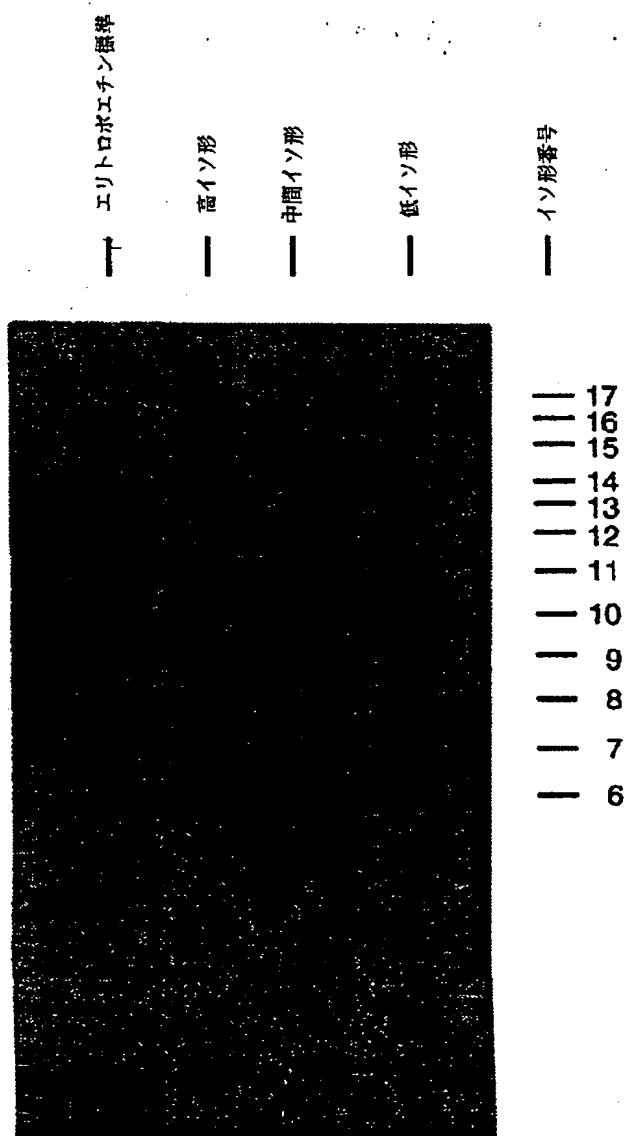
【図11】

FIG. 11



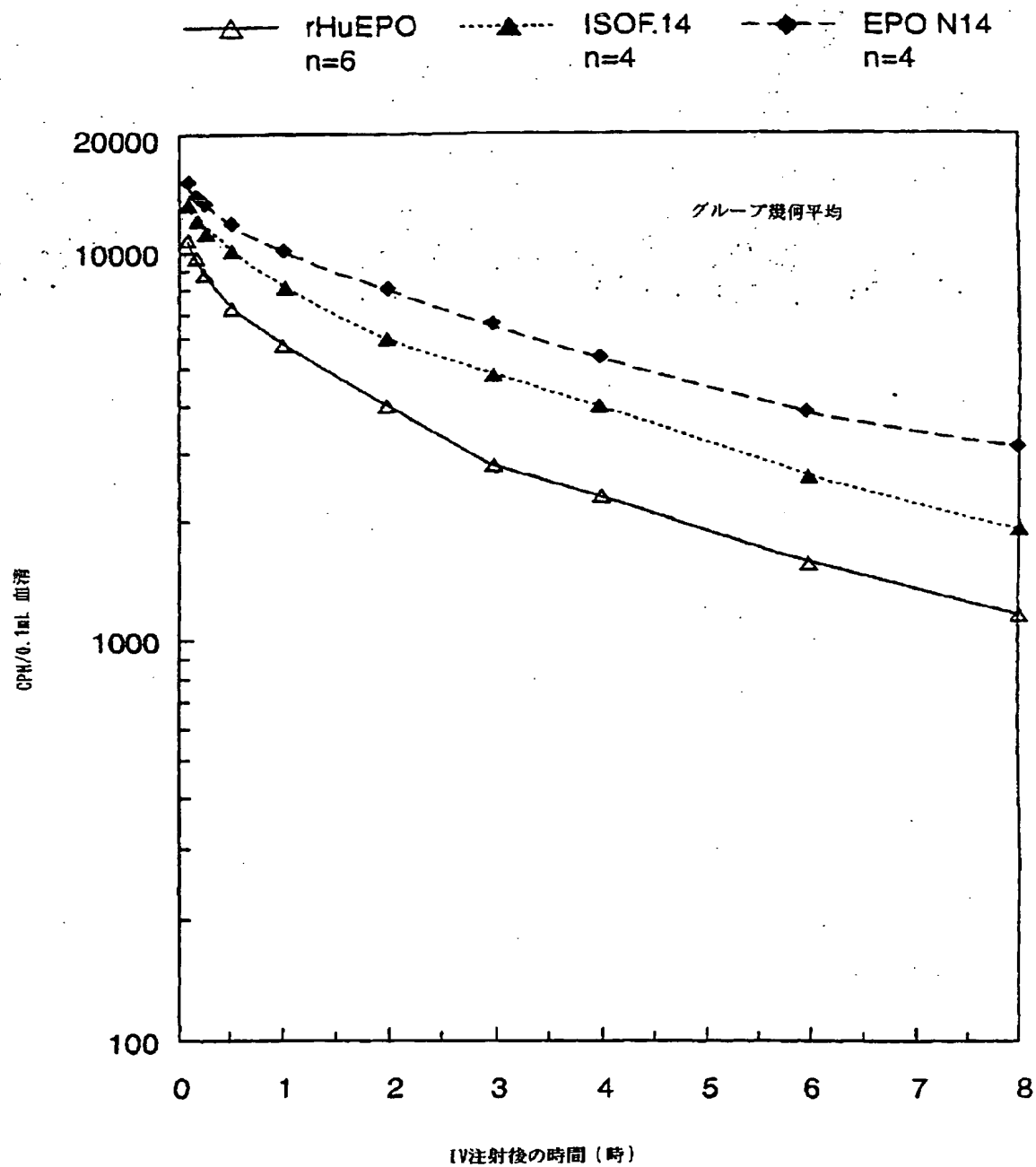
【図 12】

FIG. 12



【図13】

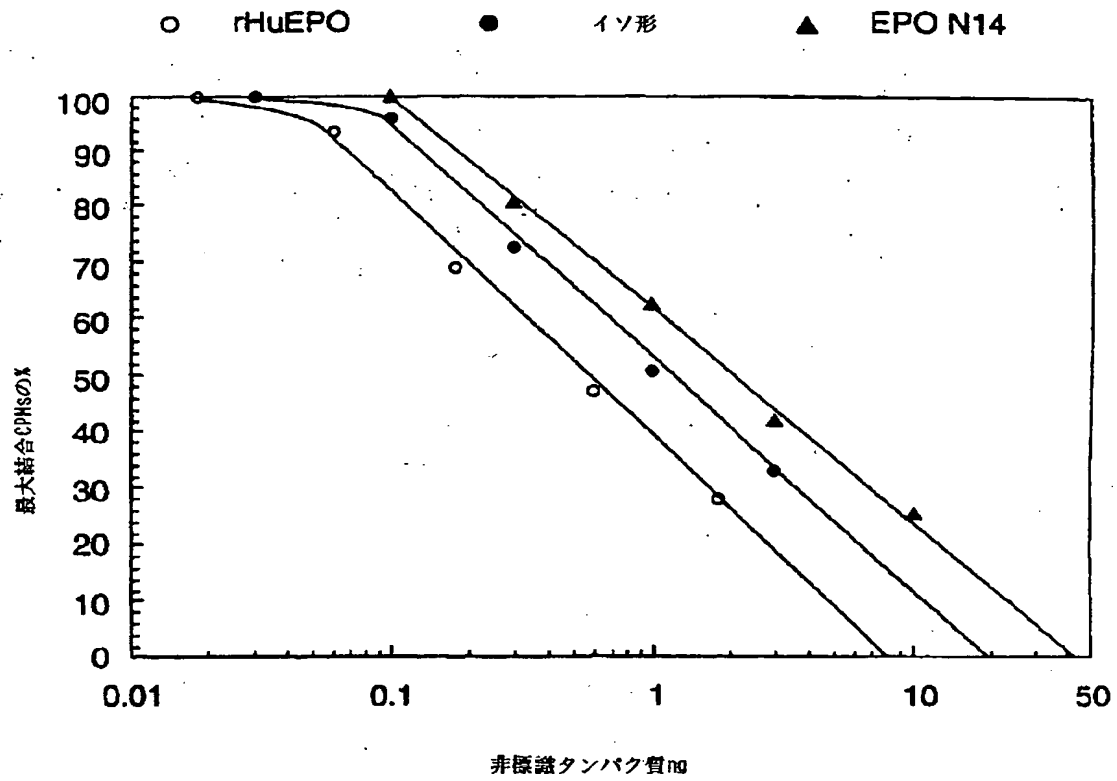
FIG. 13





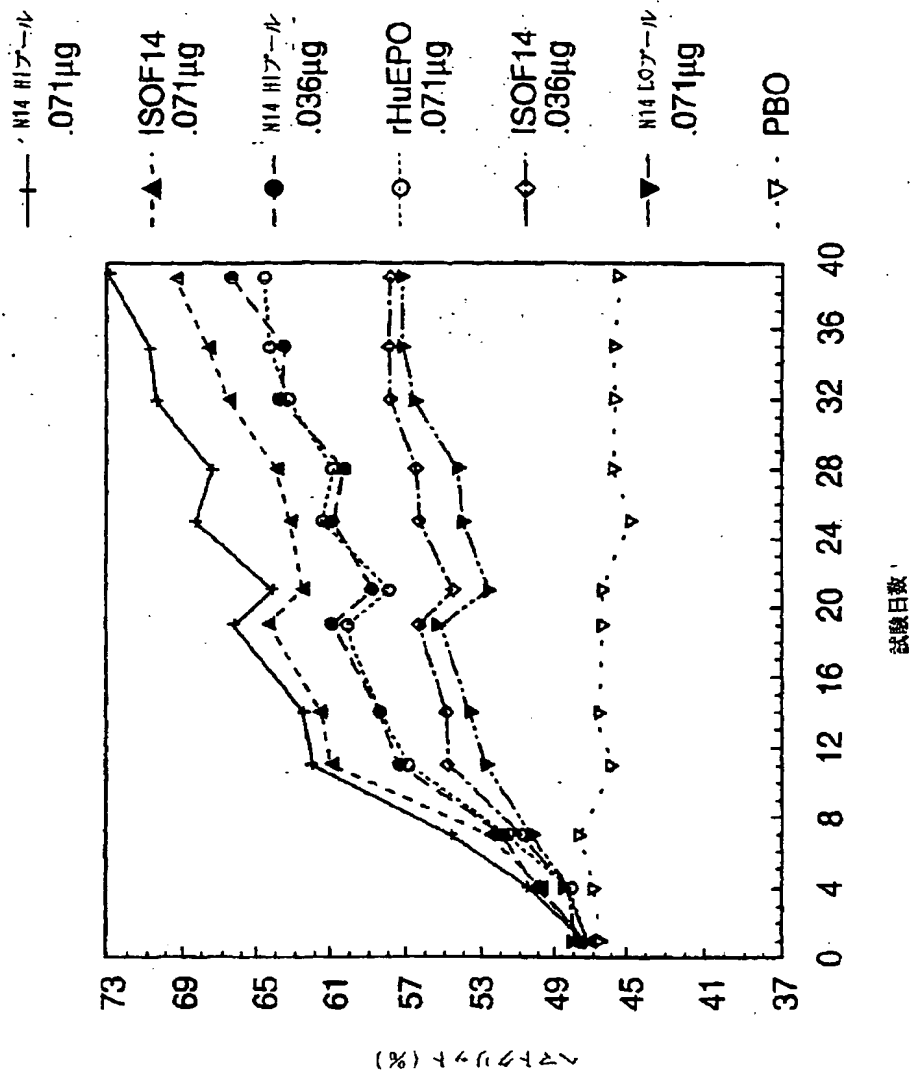
【図14】

FIG. 14



【図15】

FIG. 15



【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No. PCT/US 94/09257		
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 6 C12N15/12 C07K14/505 A61K38/18		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 428 267 (AMGEN) 22 May 1991 see the whole document	1-10, 17-19
A	EP,A,0 267 678 (INTEGRATED GENETICS, INC.) 18 May 1988 see the whole document	1-19
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 18 January 1995		Date of making of the international search report 01. 02. 95
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5815 Patentlaan 2 NL - 2230 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 631 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Masturzo, P

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 94/09257

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0428267	22-05-91	AU-B- 646822	10-03-94
		AU-A- 6604290	16-05-91
		CA-A- 2027635	14-04-91
		CN-A- 1051936	05-06-91
		JP-T- 4502331	23-04-92
		WO-A- 9105867	02-05-91
EP-A-0267678	18-05-88	US-A- 4954437	04-09-90
		AU-A- 7842987	16-03-89
		JP-A- 63185396	30-07-88

フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I
C 0 7 K 14/505		8318-4H	
C 1 2 N 5/10			
C 1 2 P 21/02	K	9282-4B	
/(C 1 2 P 21/02			
C 1 2 R 1:91)			
	9455-4C		
		A 6 1 K 37/24	ACC

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, ES, FI, G B, HU, JP, KP, KR, KZ, LK, LT, LU, LV, MG, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SK, UA, UZ, V N

(72)発明者 ビルン, トーマス・イー  
 アメリカ合衆国、バージニア・22207、ア  
 ーリントン、ノース・ナツシュ・ストリー  
 ト・1200、ユニット・811

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**